

**ナイロン再資源化と 6-アミノヘキサン酸のバイオ生産のための  
酵素遺伝子の同定と代謝工学への応用**

**2018 年**

**竹原一起**

## 目 次

第1編 緒論.....	1
参考文献.....	5
第2編 ナイロン加水分解酵素の構造安定化	
第1章 変異体を用いたナイロン加水分解酵素の熱安定化機構の解析	
1.1 諸言 .....	7
1.2 実験材料.....	9
1.3 実験方法.....	11
1.4 実験結果および考察.....	27
1.4.1 部位特異的変異導入法による変異酵素の構築	
1.4.2 各種変異酵素の精製	
1.4.3 円二色性(CD)測定	
1.4.4 超遠心分析	
1.4.5 <i>FseI-AsiSI</i> 断片の変異導入率	
1.4.6 <i>BamHI-PstI</i> 断片の変異導入率	
1.4.7 アミノ酸置換体の取得	
1.4.8 ポリクローナル抗体の作成	
1.4.9 ウェスタンブロッティング	
1.4.10 ELISA	
1.4.11 RT-PCR	
1.4.12 分子動力学シミュレーションを用いた変異体の挙動解析 (アミノ酸残基間距離測定)	
1.4.13 分子動力学シミュレーションを用いた変異体の挙動解析 (残基間距離の経時変化)	
1.5 結論.....	44
参考文献.....	47

第2章	有機溶媒中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能の解析	
2.1	諸言 .....	48
2.2	実験材料 .....	49
2.3	実験方法 .....	49
2.4	実験結果および考察 .....	51
2.4.1	エチレングリコール中での NylC の酵素反応	
2.4.2	EG 中における NylC の円二色性(CD)測定	
2.4.3	EG 中における NylC の二次構造予測	
2.5	結論 .....	57
	参考文献 .....	58

### 第3編 *Arthrobacter* sp. KI72 のゲノム解析と 6-アミノヘキサン酸代謝系の同定

第3章	<i>Arthrobacter</i> sp. KI72 のゲノム解析	
3.1	諸言 .....	59
3.2	実験材料 .....	60
3.3	実験方法 .....	60
3.4	実験結果および考察 .....	61
3.4.1	<i>Arthrobacter</i> sp. KI72 のゲノム抽出	
3.4.2	ドラフトゲノム解析およびドラフトアセンブル	
3.4.3	アノテーション	
3.5	結論 .....	62
	参考文献 .....	63

第4章	<i>Arthrobacter</i> sp. KI72 の 6-アミノヘキサン酸代謝系の同定	
4.1	諸言 .....	65
4.2	実験材料 .....	65
4.3	実験方法 .....	68
4.4	実験結果および考察 .....	77
4.4.1	最少培地における <i>Arthrobacter</i> sp. KI72 とその変異体の増殖実験 1	
4.4.2	代謝経路の予測と候補遺伝子の探索	
4.4.3	NylD および NylE の系統的解析	
4.4.4	NylD および NylE の遺伝子構造	
4.4.5	発現プラスミドの構築と精製	
4.4.6	活性測定	

4.4.7	最少培地における <i>Arthrobacter</i> sp.KI72 とその変異体の増殖実験 2	
4.5	結論.....	112
	参考文献.....	113
第5章 NylD/NylE アイソザイムの生化学的特徴づけ		
5.1	諸言.....	117
5.2	実験材料.....	117
5.3	実験方法.....	117
5.4	実験結果および考察.....	122
5.4.1	発現プラスミドの構築と精製	
5.4.2	活性測定	
5.4.3	NylD/NylE アイソザイムの RT-PCR	
5.5	結論.....	131
	参考文献.....	132
第6章 NylD 結晶化条件の検討		
6.1	諸言.....	134
6.2	実験材料.....	135
6.3	実験方法.....	135
6.4	実験結果および考察.....	137
6.4.1	酵素精製	
6.4.2	NylD <sub>1</sub> の結晶化	
6.4.3	NylD <sub>1</sub> の X 線回折強度データの回収	
6.4.4	NylD アイソザイムのアライメント	
6.5	結論.....	144
	参考文献.....	145
第 4 編 総括.....		
		147
論文目録.....		
		149

## 第1編 緒論

合成ポリアミドであるナイロンは、絹に代わる人口繊維として 1930 年代にデュポン社により開発された素材である。その優れた物性や耐久性からストッキングへの応用を契機に急激に市場を拡大し、現在では一般に広く使用され認知された素材となっている。特に 6 ナイロンと 66 ナイロンはナイロン全体の約 90% を占め、世界的に大量に生産されており、その年間生産量は約 400 万トンにも達する。

また、それまでの合成繊維は植物を原料として製造されていたが、ナイロンは初めて石油や石炭などの化石燃料を原料として合成された繊維であることも知られている。6 ナイロンは工業的に、石油あるいは石炭から、ベンゼンおよびシクロヘキサンを経由して  $\epsilon$ -カプロラクタムを生成し、さらにこれを開環重合することにより合成される<sup>1)</sup>。同様に 66 ナイロンは 6 ナイロンの中間原料であるアジピン酸と、別の石油由来原料であるヘキサメチレンジアミンとを重合することにより合成される<sup>2)</sup>。このように化石燃料は様々な物質の原料として使用されているが、埋蔵量が有限であるために枯渇が懸念されており、近年ではその使用量削減が求められている。これらナイロンのいずれの合成過程においても高温/高圧などの高いエネルギーを要求し、さらには多量の酸/塩基や有機溶媒が副原料として必要となる。加えて、これらナイロンは製品として使用した後は、その 85% 以上が焼却処理され、その処理工程では大量の温室効果ガスが排出される。これらの生産から廃棄までの工程で排出される有害物質は環境汚染の原因となり、問題視する声がますます高くなってきている。このように、急速に発展した化石燃料を原料とした化学産業は、われわれの経済や生活を豊かにしたが、限られた資源に過度に依存し、その営為において環境への深刻なダメージを与え続ける現代の産業活動は、本質的に持続不可能な行為である。

これらの問題に対し、近年では非化石燃料資源を原料とした物質生産や、化石資源由来製品のリサイクルの試みが活発化している。また、今日では CSR(企業の社会的責任)の観点から、産業活動を行う上で持続可能な社会の実現に貢献しているという点が企業のアピールポイントとなり、産業的にもますますリサイクルが重要視されてきている。プラスチックの場合、現在では 3 つの方法が実用化されている。1 つめはマテリアルリサイクルと呼ばれるもので、使用済みプラスチックを物理的に裁断または融解し、製品に成形する手法である。2 つめはサーマルリサイクルと呼ばれるもので、廃プラスチックを焼却し、発生したエネルギーを回収/利用する手法である。3 つめがケミカルリサイクルと呼ばれるもので、化学反応を利用して、廃プラスチックを原料やモノマーに変換する手法である。これらの中でも、とくにケミカルリサイクルは廃プラスチックからの多彩な物質への変換が期待できるため、研究の余地が多く残されているとともに、新しい方法が盛んに提案されている。これらのリサイクルは、回収が容易なポリエステルや

塩化ビニルなどを主として行われてきたが、現在ではナイロンも複数の企業が連携しケミカルリサイクルの方策を進めている<sup>3-4)</sup>。

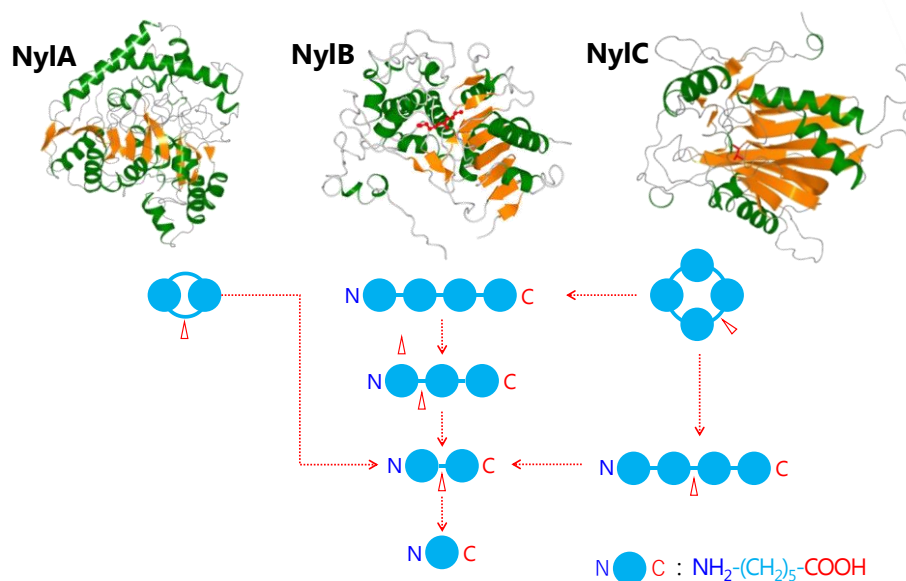
これらの従来のリサイクル方法に対して、現在ではより進んだ方法が世界中の多くの研究グループにより実用化されようとしている。それが、微生物の生物機能を利用したリサイクル方法である。最近では微生物が様々な化学製品の生産に生物工場として応用されてきている。これまでに酒類/有機酸/アミノ酸/医薬品やポリマーなどに微生物を利用した物質生産は利用されてきたが、その魅力は環境への適合性である。従来のケミカルリサイクルが依然として酸/塩基等の薬品や、高いエネルギー反応を必要とするのに対し、生物機能を用いた手法は環境に適合した物質とともに比較的温和な条件で反応を進めることが可能である。生物機能を用いたナイロンリサイクルでは、バイオマスや廃棄済みのナイロンを出発物質として、ナイロンの原料を生成する試みがあり、実用化に近い形までに研究が進んでいる<sup>5-8)</sup>。バイオマスを用いたものの例として、グルコースを出発原料に TCA サイクル、 $\alpha$ -ケトグルタル酸および 2-オキソヘプタン二酸を経由して 6 ナイロンの原料である 6-アミノヘキサン酸(Ahx)へ完全に酵素的に変換する経路が報告されている<sup>9)</sup>。また、植物性の油脂を出発物質に脂肪酸代謝関連酵素を利用することで $\omega$ -酸化/ $\beta$ -酸化を経て最終的には 66 ナイロンの原料であるアジピン酸を生合成する手法も報告されている<sup>10)</sup>。

このような状況の中、われわれの研究グループもナイロンに関する酵素研究のフロンランナーとして研究を進めてきた。この研究は 1970 年代にナイロン分解菌 *Arthrobacter* sp. KI72 が染色工場廃液中より単離されたことから始まった。KI72 株はナイロンオリゴマーを単一の窒素/炭素源として生育するバクテリアで、それまで生分解が難しいと考えられていたナイロンの研究に新たな知見をもたらした<sup>11)</sup>。KI72 株は pOAD1、pOAD2 および pOAD3 の 3 種のプラスミドを保有する。過去の研究により、pOAD2 上にコードされた NylA、NylB および NylC の 3 種の酵素がナイロンオリゴマーから Ahx への分解を担っていることが明らかとなっている(**Fig. 1**)<sup>12)</sup>。Ahx-cyclic dimer hydrolase (NylA; EC3.5.2.12)はアミダーゼドメイン保有加水分解酵素ファミリーに属し、Ahx 環状二量体を加水分解し、Ahx 直鎖状二量体を生成する<sup>13)</sup>。Ahx dimer hydrolase (NylB; EC3.5.1.46)はセリン反応性加水分解酵素のペニシリン認識ファミリーに属し、Ahx オリゴマーをエキソ型で加水分解する<sup>14-15)</sup>。Ahx oligomer hydrolase (NylC; EC3.5.-.-)は三量体以上の Ahx 環状/直鎖状オリゴマーをエンド型で加水分解する<sup>14-16)</sup>。また、耐熱化 NylC 変異体は薄層の 6 ナイロン(厚さ 0.26  $\mu$ m)を定常的な反応速度でほとんどすべて分解することが報告されている。上記 3 種の酵素 NylABC が協働することにより、ナイロンオリゴマーはモノマーまで分解されることが明らかとなっているが、それ以降にモノマーである Ahx は KI72 株のどのような酵素によって、どのような物質に変換されるかは不明である。

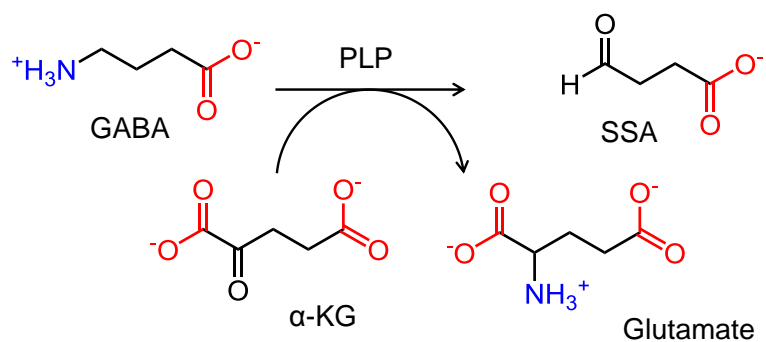
4-アミノ酪酸( $\gamma$ -アミノ酪酸: GABA)は C4 のメチレン鎖の一方の末端にアミノ基、もう一方の末端にカルボキシル基を持つ Ahx と類似した構造の物質で、ほとんどの原核/真核生物においてグルタミン酸デカルボキシラーゼにより L-グルタミン酸の脱炭酸により得られる非タンパク性のアミノ酸である。GABA は哺乳類の細胞内で神経伝達物質として重要な役割を果たしている<sup>17)</sup>。植物においては、ストレスがカルモジュリン依存性シグナル伝達を引き起こし、その結果増加した細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  によりグルタミン酸デカルボキシラーゼが活性化されることが明らかとなっている<sup>18)</sup>。GABA の分解は 4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.19)によるコハク酸セミアルデヒド(SSA)へのアミノ基転移反応により開始する(**Fig. 2**)<sup>19)</sup>。その後、SSA は NAD(P)<sup>+</sup>依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(EC 1.2.1.16)によりコハク酸へと酸化されるか(**Fig. 3**)、もしくはコハク酸セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.79)により  $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸へと還元される<sup>20)</sup>。Ahx と構造が類似している GABA の代謝経路は、不明である KI72 株のナイロンモノマー以降の代謝経路を解明する鍵となる可能性がある。

ナイロンモノマーである 6-アミノヘキサン酸を基質とした酵素反応はこれまでに報告がなく、この変換経路を明らかにすることは新規代謝経路の同定の観点から重要と考えられる。また、この代謝経路の解明が、それを利用した物質変換に応用できる可能性がある。KI72 株のナイロンモノマー以降の代謝経路の解明と、その代謝経路を利用した有用物質の生産が本研究で主題として取り上げたものである。

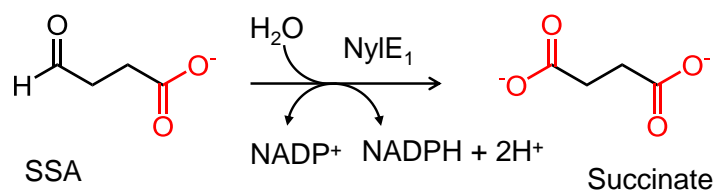
第 2 編では、NylC 変異導入による効果および有機溶媒中の酵素反応による研究をもとに、ナイロン加水分解酵素のナイロン加水分解酵素の構造安定化検討した。第 1 章では、NylC のアミノ酸置換と熱安定性との関係について解明するため p2-NylC の界面にアミノ酸置換を施し、熱安定性と構造形成能から議論した。第 2 章では有機溶媒中でのナイロン加水分解酵素の構造および機能の解析を行い、二次構造と活性の相関を検討した。第 3 編では、KI72 株の Ahx 以降の代謝経路の同定を目的に検討を行った。第 3 章では、ナイロン分解菌 KI72 ゲノムのもつ遺伝情報の総合的解析およびナイロンオリゴマー代謝にかかわる遺伝子を分析するため、ゲノム解析を行った。第 4 章では、Ahx 代謝経路の予測と KI72 ゲノム情報を用いた代謝関連酵素の抽出を行った。また、候補として抽出したタンパク質の部分的な生化学的特徴づけを行った。第 5 章では、NylD の機能および反応機構を理解するため、結晶化条件の検討を行った。また、既知酵素である Ara-GABT のアミノ酸配列を用いてアライメントを行い、その反応機構について議論を行った。



**Fig. 1** NylA/NylB/NylC のナイロンオリゴマー分解様式



**Fig. 2** 4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼによるアミノ基転移反応



**Fig. 3** コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼによる酸化反応



## 参考文献

- 1) Travis AS, Schroter HG, Homburg E, Morris PJT. Determinants in the Evolution of the European Chemical Industry, 1900–1939: New Technologies, Political Frameworks, Markets and Companies. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, p 115 (1998).
- 2) McIntyre JE. Synthetic fibres: Nylon, Polyester, Acrylic, Polyolefin (1st ed.). Cambridge: Woodhead. p. 10. ISBN 9780849325922 (2005).
- 3) Chen J, Li Z, Jin L, Ni P, Liu G, He H, Zhang J, Dong J, Ruan R. Catalytic hydrothermal depolymerization of nylon 6. *J Mater Cycles Waste Manag* 12:321–325 (2010).
- 4) Iwaya T, Sasaki M, Goto M. Kinetic analysis for hydrothermal depolymerization of nylon 6. *Polym Degrad Stabil* 91(9):1989–1995 (2006).
- 5) Chen Y, Nielsen J. Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr Opin Biotechnol* 24(6):965–972 (2013).
- 6) Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc* 116(1):399–400 (1994).
- 7) Polen T, Spelberg M, Bott M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. *J Biotechnol* 167(2):75–84 (2013).
- 8) Sattler JH, Fuchs M, Mutti FG, Grischek B, Engel P, Pfeffer J, Woodley JM, Kroutil W. Introducing an in situ capping strategy in systems biocatalysis to access 6-aminohexanoic acid. *Angew Chem Int Ed* 53(51):14153–14157 (2014).
- 9) Turk SC, Kloosterman WP, Ninaber DK, Kolen KP, Knutova J, Suij E, Schürmann M, Raemakers-Franken PC, Müller M, de Wildeman SM, Raamsdonk LM, van der Pol R, Wu L, Temudo MF, van der Hoeven RA, Akeroyd M, van der Stoep RE, Noorman HJ, Bovenberg RA, Trefzer AC. Metabolic engineering toward sustainable production of nylon-6. *ACS Synth Biol* 5(1):65–73 (2016).
- 10) Picataggio S, Beardslee T. Biological methods for preparing adipic acid. US patent US 8,241,879 B2 (2012).
- 11) Okada H, Negoro S, Kimura H, Nakamura S. Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers. *Nature* 306(5939):203–206 (1983).
- 12) Negoro S. Biodegradation of nylon oligomers. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(4):461–466 (2000).
- 13) Yasuhira K, Shibata N, Mongami G, Uedo Y, Atsumi Y, Kawashima Y, Hibino A, Tanaka Y, Lee Y-H, Kato D, Takeo M, Higuchi Y, Negoro S. X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation. *J Biol Chem* 285(2):1239–1248 (2010).

- 14) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Mizuno N, Wakitani Y, Tsurukame J, Matsumoto K, Kawamoto I, Takeo M, Higuchi Y. X-ray crystallographic analysis of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase: molecular basis for the birth of a nylon oligo-substrate J Biol Chem 280: 39644–39652 (2005).
- 15) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y. Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex: catalytic mechanism of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase. J Mol Biol 370(1):142–156 (2007).
- 16) Negoro S, Shibata N, Tanaka Y, Yasuhira K, Shibata H, Hashimoto H, Lee Y-H, Oshima S, Santa R, Oshima S, Mochiji K, Goto Y, Ikegami T, Nagai K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y. Three dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis. J Biol Chem 287(7):5079–5090 (2012).
- 17) Macdonald RL, Olsen RW. GABA: a receptor channels. Annu Rev Neurosci 17(1):569–602 (1994).
- 18) Shelp BJ, Bown AW, McLean MD Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. Trends Plant Sci 4(11):446–452 (1999).
- 19) Schneider BL, Ruback S, Kiupakis AK, Kasbarian H, Pybus C, Reitzer L. The Escherichia coli *gabDTPC* operon: specific  $\gamma$ -aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. J Bacteriol 184(24):6976–6986 (2002).
- 20) Kockelkorn D, Fuchs G. Malonic semialdehyde reductase, succinic semialdehyde reductase, and succinyl-coenzyme A reductase from *Metallosphaera sedula*: enzymes of the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in *Sulfolobales*. J Bacteriol 191(20):6352–6362 (2009).

## 第2編

### ナイロン加水分解酵素の構造安定化

#### 第1章

#### 変異体を用いたナイロン加水分解酵素の熱安定化機の解析

##### 1.1 諸言

NylC は *Arthrobacter* sp. KI72 株(p2-NylC、および2種の好アルカリ性細菌 *Agromyces* sp. KY5R 株(A-NylC)、*Kocuria* sp. KY2 株(K-NylC)に見いだされている。3種の NylC の熱安定域は p2-NylC が約 40°C、A-NylC が約 50°C、K-NylC が約 60°Cとなっている。一方で、以前に行われた A-NylC の X 線結晶構造解析では、テトラマー、ダイマー、及びモノマーとして構造が得られ NylC はホモテトラマー及びダイマーの形成が推測されている。p2-NylC と A-NylC の間では、異なる5つのアミノ酸置換(G111S, D122G, H130Y, L137A, V225M)が存在し、225位は AB 界面に位置するが、それ以外は AD 界面に位置する。また A-NylC と K-NylC の間で異なる10アミノ酸置換のうち、36位は AD 界面、263位は AB 界面に位置する。そこで本章では、熱安定性とテトラマー形成との関連性について着目し検討を行った。

p2-NylC、A-NylC 及び K-NylC 間で異なる異なるアミノ酸配列について、p2-NylC を親型に A-NylC もしくは K-NylC 型への置換体を作成し、個々のアミノ酸の熱安定性への効果を明確にした。また、AD/AB それぞれの界面で加算的に耐熱性を高める変異体のみを p2-NylC に導入した G122 Y130 A36 Q263 変異体は、最も熱安定性の高い酵素となった。次に、NylC が生理的条件下において、モノマー、ダイマー、及びテトラマーの可逆的状态にあると推測し、これを証明するため、超遠心実験によりサブユニット会合度についての検討を行った。続いて熱安定性とテトラマー形成において重要であることが示された、モノマー界面に位置するアミノ酸；上記122位、137位、そしてモノマーAB界面に位置する299位に着目し、部位特異的変異導入により様々なアミノ酸に置換し、得られた変異酵素については、構造レベルでの評価を行った。

また、遺伝子とそのコードするタンパク質の構造と機能の相関関係を調べるために、遺伝子内に変異を導入し、タンパク質の機能にどのような影響を及ぼすかを調べるのは非常に有効な手段であり、なかでも PCR 法を用いた変異誘発法は簡便で非常に効率が良く有効である。PCR 法にて変異を導入する手法として、大きく部位特異的変異導入法(Site-directed mutagenesis)と無作為変異導入法(Random mutagenesis)の2種類の方法があり、前者は標的とする酵素の立体構造が既に解かれている場合、もしくは詳細な生化学的解析がなされている場合には、部位特異的変異体の作製や分子改質が可能となる。逆に、後者は酵素の立体構造あるいは詳細な生化学的解析がなされていない場合

に、タンパク質分子の持つ受容能力と柔軟性を利用して、ある特定の機能を持つ酵素を獲得するといった場合に有効な手段となる。そこで本章では、これまでに取得できていた高機能型酵素(NylCp2-G<sup>122</sup>Y<sup>130</sup>A<sup>36</sup>Q<sup>263</sup>)に核酸アナログ(8-oxo-dGTP、dPTP)を用いたランダム変異導入を行い、変異ライブラリーの作成を試みた。そして、得られた変異型酵素の解析から、機能変化に関わる未知のアミノ酸残基の取得を目指した。

また、様々な成分を含む試料の中から目的とする成分だけを識別し、かつその成分の濃度や量を知るために、錯体の形成や溶媒抽出など、ある化学種に選択的な化学反応を利用する分析法が確立されてきた。一方、生体内では膨大な種類の物質が存在するため、特定の物質の評価には、優れた分子認識機能を備えた系での分析方法が必要になる。生体成分の有力な分析法の1つに、抗原抗体反応を利用した免疫化学的測定法、即ち免疫分析法がある。抗原抗体反応はその特異性の高さから、生化学や医学、臨床検査の分野においても、高感度分析として広く用いられている。本研究では、変異ライブラリー作成時に取得した変異体に対し、免疫分析を用いてその細胞内局在性と分子量を調べた。また非発現という現象に対し、変異酵素のRNAを抽出し、逆転写反応を用いた遺伝子発現による影響も検討した。

近年のコンピュータ技術の発達は、対象とする原子数が比較的少ない単分子だけでなく、膨大な計算を必要とするタンパク質のようなマイクロ分子に対する計算学的なアプローチ、すなわち分子の構造変化や運動状態を分子シミュレーション(Molecular Simulation)する事を可能にした。このような分子シミュレーションの1つである分子動力学法(Molecular Dynamics : MD)は対象となる原子や分子の1つ1つに運動方程式をあてはめ、数值的に解くことによって、その位置や速度、エネルギーの時間変化を追跡する事ができ、分子系の動的な構造変化や機能発現をシミュレートする手法である。そしてタンパク質のような複雑で、構造が大きく変動する分子に対しても、原子レベルでのシミュレートが可能である。よって現在、生体内の標的タンパク質と強く相互作用する化合物を探すといった医薬品分野にも取り入れられている。今回はこのMDを用いて、前駆体型変異酵素のX線結晶構造解析データから、活性型変異体酵素のデータを作成し、分子の挙動の解析と、生化学データとの比較を行った。

## 1.2 実験材料

### 1.2.1 使用菌株、プラスミドおよび酵素

本研究で使用した菌株、プラスミドおよび酵素を Table 1-1 に示した。

Table 1-1 Bacterial strain and plasmids used in this study.

Strains or Plasmids	Characteristic(s)	Source or Reference
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>e14<sup>-</sup></i> ( <i>mcrA<sup>-</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )/F <sup>+</sup> [ <i>traD36</i> , <i>proAB<sup>+</sup></i> , <i>lac I<sup>q</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Takara-Bio
Plasmids		
pSKFC4 (p2-NylC)	Amp <sup>r</sup> , 1.1 kbp <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragments containing p2- <i>nylC</i> gene cloned between the <i>Bam</i> HI site and the <i>Pst</i> I site of pBluescript SK(+)	1)
D122R	Asp122 in the p2-NylC is substituted for Arg, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
D122K	Asp122 in the p2-NylC is substituted for Lys, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
D122V	Asp122 in the p2-NylC is substituted for Val, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
D122G	Asp122 in the p2-NylC is substituted for Gly, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
L137A	Leu137 in the p2-NylC is substituted for Ala, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
G <sup>122</sup> Y <sup>130</sup> A <sup>36</sup> Q <sup>263</sup>	Asp122, His130, Asp36 and Glu263 in the p2-NylC is substituted for Gly, Tyr, Ala and Gln, respectively. Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
Q299D	Gln <sup>299</sup> in the G <sup>122</sup> Y <sup>130</sup> -A <sup>36</sup> Q <sup>263</sup> is substituted for Asp, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	
Q299E	Gln <sup>299</sup> in the G <sup>122</sup> Y <sup>130</sup> -A <sup>36</sup> Q <sup>263</sup> is substituted for Glu, Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> promoter	

### 1.2.2 使用機器

本実験に使用した機器を以下に示した。

高圧蒸気滅菌機：平山製作所製 HA-24 型  
 pH メーター： HORIBA 製 F-22 型  
 振盪培養器： TAITEC 製 BIO-SHAKER BR40LF 型  
                   TAITEC 製 BIO-SHAKER UD-200 型  
 恒温器： 田葉井製作所製 電気定温器 ET-2 型  
                   SANYO 製 MIR-153 型  
 遠心分離機： トミー精工製 微量高速冷却遠心分離機  
 分光光度計： 日立製作所製 ダブルビーム分光光度計 U-2000 型  
 超音波破碎機： トミー精工製 UD-200 型  
 電子天秤： SARTORIUS 製 AUW220D 型  
 スラブ型電気泳動装置： ATTO 製 Compact PAGE-twin AE-7341 型  
 クロマトグラフィシステム： Amersham Bioscience 製 AKTAprime  
 水平サブマリン型電気泳動装置： ADVANCE 製 Mupid-2 型 Mupid-ex (u)型  
 紫外線照射装置： ATTO 製 DT-20M 型  
 写真撮影装置： ATTO 製 N-50 型  
 PCR 装置： TaKaRa 製 TP600 D-5767 型  
 ブロッティング装置 ATTO 製 AE-7500  
 MILLIPORE 製 Immobion PVDF Transfer Membranes (Pore Size: 0.45  $\mu$ m)  
 ATTO 製 ブロッティング用ろ紙 (65×65 mm)  
 二次抗体： Abcam 製 Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)  
 発色基質： ATTO 製 EZ WestBlue (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)  
 KPL 製 Protein detector HRP Microwell kit  
 BTD 製 Crocodile Mini Workstation  
 計算機： Prime PC BTO(GEFORCE GTX TITANX SLI)  
 プログラム： AMBER (Ver. 14)  
 パラメータ： ff14SB (力場設定), TIP3P(溶媒分子の配置)  
 立体構造の可視化：  
 VMD (visual molecular dynamics) (Ver. 1.9.2) (The Theoretical and Computational Biophysics Group)

### 1.2.3 使用培地

本実験で使用した培地を Table 1-2~Table 1-4 に示した。TB 培地及び LB 培地に、アンピシリンを終濃度 100 mg/ml となるように加えたものをそれぞれ TBA 培地および LA 培地とした。また LA 培地に寒天末を 1.5 % (w/v) に調整したものを LA 寒天培地として用いた。

Table 1-2 Composition of TB medium

Bacto-tryptone	12 g
Bacto-yeast extract	24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.5 g
Glycerol	4 ml
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 1-3 Composition of LB medium

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 1-4 Composition of SOC medium

Bacto-tryptone	20 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
MgCl <sub>2</sub>	0.19 g
Glucose	0.9 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

### 1.3 実験方法

#### 1.3.1 部位特異的変異導入法による変異酵素の構築及び塩基配列の決定

TaKaRa PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit の説明書に準じて NylC 変異酵素の構築を行った。Table 1-5 に示すプライマーを用いて PCR を行った。PCR 液の組成と PCR サイクルを Table 1-6~Table 1-7 に示した。得られた PCR 増幅産物を用いてそれぞれの *E.coli* JM109 に形質転換した。構築された組み換えプラスミドの NylC 領域を 1.3.2 に示す手順で塩基配列の確認を行った。

Table 1-5 Sequences of PCR primers

Oligonucleotides	5'→3'	Tm(°C)
F D122G	GGGGTGAGCG <b>GG</b> CGCGCTCCTGGAACGCCTC	74.7
R D122G	TTCCAGGAGCGCG <b>C</b> CGCTCACCCCGGCGCC	70.6
F D122NNN	GGGGTGAGC <b>NNN</b> GCGCTCCTGGAACGCCTC	71.4
R D122NNN	TTCCAGGAGCGC <b>NNN</b> GCTCACCCCGGCGCC	72.8
F L137A	GCCGAG <b>G</b> CCCAGCTGGTGTCTCGTCGGCG	74.2
R L137A	CAGCTG <b>GG</b> CCTCGGCGAAGCCGGTGCG	74.2
F Q299NNN	GGCATC <b>NNN</b> CCGTTCCACACCGACATGGACGGCGAC	72.0
R Q299NNN	GGACGG <b>NNN</b> GATGCCGCGGTGCATCGAACTGTG	69.3

$T_m = 60.8 + 0.41 \times (\%GC) - 500/L$  (L: primer length)

Table 1-6 Composition of PCR mixture

PrimeSTAR Max Premix (2×)	25 $\mu$ l
Primer 1 (10 pmol)	1 $\mu$ l
Primer 2 (10 pmol)	1 $\mu$ l
Template DNA (100pg/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Distilled water	22 $\mu$ l
	55 $\mu$ l

Table 1-7 PCR program

98°C		2 min
98°C	30 cycles	10 sec
60°C		15 sec
72°C		23 sec
72°C		1 min

### 1.3.2 塩基配列の決定

塩基配列の決定は Dideoxy 法により行った。シーケンシング反応には Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (GE Healthcare 製)を使用して行った。プライマーには蛍光標識したシーケンス用プライマー(Table 1-8)を使用し、反応サイクルは Table 1-9 に示すサイクルで行った。また、ゲルの作製及び泳動には Table 1-10 に示す TBE 泳動用緩衝液を使用した。なお、ポリアクリルアミドゲルの作製及び電気泳動は取扱説明書 [SHIMADZU (株)]に準じて行った。また、シーケンシング後の



塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver. 5.2 (ゼネティックス製)を使用した。

Table 1-8 Sequence of cycling reaction primer

Oligonucleotides	5'→3'
F D122G	CGCACGTCGCCGAGACGACGGAACG
R Q299NNN	GTCGTGCCGAACCCGGTCGGTGTGAT

Table 1-9 PCR program

98°C	25 cycles	3 min
98°C		1 min
60°C		45 sec
72°C		1.5 min
72°C		1 min

Table 1-10 Composition of TBE buffer

Tris-HCl	10.8 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.5 g
EDTA・3Na	0.98 g
Distilled water	Up to 1000 ml

### 1.3.3 各変異酵素の精製

#### 1.3.3.1 粗酵素液の調製

各変異酵素プラスミドを *E. coli* JM109 のコンピテントセルに添加し、0°Cで30分間インキュベーションした。その後、ヒートショック (42°C, 45sec)を与え、氷上で直ちに冷却した。これを SOC 培地に添加し、37°Cで1時間培養した。この培養液を 1 mM isopropyl-  $\beta$ -D-thio galactoside (IPTG)を含む TBA 培地に加え、25°Cにて60時間培養した。培養後、遠心分離 (4°C, 8,000rpm, 10 min)により集菌し、Buffer A (10 %グリセロールを含む 20 mM リン酸緩衝液)で2回洗浄した後、同緩衝液に懸濁した。その後、超音波破碎 (20 kHz, 5 min×4)を行い、遠心分離 (4°C, 30,000×g, 30 min)にて得られた上清を粗酵素液とした。

#### 1.3.3.2 硫安分画

1.3.3.1 で調製した粗酵素液に硫酸アンモニウムを 40 %飽和となるように加え十分に攪拌した後、30分間氷上で静置した。その後、遠心分離 (4°C, 30,000×

g, 10 min)を行い、得られた沈殿を Buffer A 20ml に溶かした。

#### 1.3.3.3 陰イオン交換クロマトグラフィー(HiTrap Q Sepharose HP)

希釈したサンプルを予め A で平衡化しておいた Hi-Trap Q Sepharose HP カラム (GE Healthcare 製)にチャージした。その後、92% Buffer A/8% Buffer B (2M NaCl, 10 %グリセロールを含む 20 mM リン酸緩衝液)で洗浄した後、全量 160 ml で 8%~20%まで Buffer B 濃度を直線的に上げることで溶出を行った。流速は 2 ml/min とし、溶出開始 5 分後から 5 ml ずつ 30 本分取した。その後、各フラクションを SDS-PAGE 分析(1.3.4 参照)し、目的タンパク質が溶出している画分を特定した。特定したフラクションを Amicon Ultra (MILLIPORE 製, 分画分子量 10kDa)を用いて遠心濃縮(4°C, 4,000g, 40min)した。

#### 1.3.3.4 サンプル濃縮

サンプルの濃縮には Centryprep YM-10 (MILLIPORE 製)を用いた。

#### 1.3.3.5 ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-200 HR)

全量約 1 ml に濃縮したサンプルを予め Buffer A で平衡化しておいた Sephacryl S-200 HR カラム(16 mm×65 cm)にチャージし、Buffer A で溶出を行った。流速は 0.5 ml/min とし、溶出開始から 50 分後に分取を開始し、2 ml ずつ 30 本分取した。1.3.3.3 と同様に SDS-PAGE 分析及び遠心濃縮を行い、精製酵素液とした。

#### 1.3.4 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

精製酵素 5  $\mu$ l に等量の 2×SDS サンプルバッファー (Table 1-11)を加え 10 分間熱処理した後、5  $\mu$ l を SDS-PAGE に供した。泳動には 17.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル (Table 1-12)を使用し、SDS 電気泳動用 buffer (Table 1-13)で泳動を行なった。泳動を終えたゲルを染色液(Table 1-14)に浸し、40 秒間電子レンジで加熱を行うことでゲルの染色を行った。次に水道水にゲルを移してさらに 10 分間電子レンジにて加熱を行うことによりゲルの脱色を行った。

Table 1-11 Composition of 2×SDS-sample buffer

2M Tris-HCl	2 ml
10% SDS	4 ml
β-Mercaptoethanol	1.2 ml
Glycerol	2 ml
1% Bromophenolblue	20 μl
Distilled water	Up to 10 ml

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

Table 1-12 Composition of 17.5% SDS-polyacrylamide gel

	Separation gel	Concentration gel
Solution A	5.25 ml	0.45 ml
Solution B	2.25 ml	—
Solution C	—	0.75 ml
APS	0.004 g	0.001 g
TEMED	5 μl	5 μl
Distilled water	1.5 ml	1.8 ml

Solution A: 29.2 % (w/v)acrylamide, 0.8%(w/v)Bis

Solution B: 18.7 % (w/v)Tris, 0.4%(w/v)SDS, pH8.8

Solution C: 6.06 % (w/v)ammonium peroxodisulfate

TEMED: *N, N, N', N'*-tetramethylene diamine

Bis: *N, N'*-methylenebisacrylamide

APS: Ammonium Peroxodisulfate

Table 1-13 Electrophoresis buffer

Tris	3.0 g
Glycine	14.4 g
SDS	1.0 g
Distilled water	Up to 1000 ml

Table 1-14 Gel staining solution

Coomassie Brilliant Blue R-250	0.3 g
Methanol	90 ml
Acetic acid	30 ml
Distilled water	Up to 300 ml

### 1.3.5 タンパク質濃度の測定 (Lowry-Folin 法)

精製酵素液の濃度を Lowry-Folin 法にて測定した。1.0 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA、ナカライテスク製)を、それぞれタンパク質濃度が 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml となるようにそれぞれ滅菌水で希釈し、標準溶液として用いた。また、精製酵素を滅菌水で適宜希釈したものをサンプル溶液として用いた。標準溶液およびサンプル溶液 200  $\mu$ l に Lowry A 液 (Table 1-15)と Lowry B 液 (Table 1-16)を 50 : 1 になるように混合した溶液を 1ml 加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、30 分静置後 1N フェノール試薬 100  $\mu$ l 添加し、速やかにボルテックスミキサーで攪拌した。30 分静置後波長 750nm の吸光度を測定することによりタンパク質の定量を行った。

Table 1-15 Composition of Lowry reagent A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 g
0.1M NaOH	Up to 1000 ml

Table 1-16 Composition of Lowry reagent B

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.0 g
Sodium potassium tartrate	2 g
Distilled water	Up to 200 ml

### 1.3.6 円二色性(CD)測定

#### 1.3.6.1 温度変化測定

精製した各酵素を 0.1 mg/ml に調製したサンプルを光路長 1mm の石英セルを使用し円二色性分光計にて測定を行った。波長 220nm で 25~95℃の温度変化測定を行った。測定条件は Table 1-17 に示した。得られたデータからバックグラウンドを差し引いた値に *inverse* 値を乗算しモル橢円率( $\theta$ )に換算した値を図示した。グラフの横軸を波長、縦軸を円偏光二色性の大きさ(左円偏光の吸光度と右円偏光の吸光度の差)としてプロットした。構造変性の始めから全体の構造が崩れるまでの傾きの中間点の温度を *T<sub>m</sub>* 値とした。

$$inverse = \frac{1}{\text{モル濃度(mol/l)} \times \text{光路長(cm)} \times \text{総アミノ酸数}}$$

Table 1-17 CD measurement condition

	Enzyme concentration (mg/ml)	Temperature (°C)	Wavelength (nm)
Scanning wavelength	0.1	25, 95	250~200
Temperature change	0.1	25~95 (+1°C/min)	220

## 1.3.7 超遠心分析

p2-NylC, NylC-L137A, 及び、 $G^{122}Y^{130}A^{36}Q^{263}$  の 3 つの酵素を、大阪大学蛋白研究所の蛋白質構造形成研究室に超遠心分析を依頼した。

1.3.8 *FseI*-*Asi*SI 断片のクローニング

## 1.3.8.1 エラープローン PCR

プラスミド pSKFC4-1( $G^{122}Y^{130}A^{36}Q^{263}$  変異酵素がベクター pBluescript SK(+) にクローン化されたプラスミド:1500µg/ml) を 1000 倍に希釈したものを鋳型とし、以下に示す条件、プライマーで PCR 法により変異導入を試みた。また、人工核酸(8-oxo-dGTP、dPTP)は終濃度が 2、10、40、70、100 になるように調整し、濃度ごとのライブラリーを作成した。

Table 1-18 Sequence of cycling reaction primer

Oligonucleotides	5'→3'
FE-Fse	GCTGGCCGGCCCTCCGGTCTTCGGG
RE-Asis	CATCACCTCGGAGGCGATCGCGCCGAGC

Table 1-19 Composition of PCR mixture

pSKFC4-2	1 µl
FE-Fse (10 µM)	1 µl
RE-Asis (10 µM)	1 µl
EX Taq	1 µl
EX Taq buffer	5 µl
dNTP Mixture	5 µl
dPTP	5 µl
8-oxo-dGTP	5 µl
Distilled water	26 µl
Total	50 µl

Table 1-20 PCR program

94°C		4 min
98°C	30 cycles	20 sec
55°C		5 sec
72°C		30 sec
72°C		5 min

ここで得られた PCR 産物を鋳型として、以下の条件で再び PCR(PCR 条件は Table. 1-20 に同じ)を行い、遺伝子中の人工核酸の除去を試みた。

Table 1-21 Composition of PCR mixture

PCR product	1 µl
FE-Fse(10µM)	1 µl
RE-Asis(10µM)	1 µl
EX Taq	1 µl
EX Taq buffer	5 µl
dNTP Mixture	5 µl
Distilled water	36 µl
Total	50µl

#### 1.3.8.2 組み換えプラスミド取得

上記で得られた PCR 産物および pSKFC4-1 の制限酵素処理を行った。条件は以下に示すものに基づき、37°Cの恒温槽で1晩インキュベートした。

Table 1-22 Composition of sample

pSKFC4-1(1500µg/ml)	2 µl
Distilled water	12 µl
NE buffer	2 µl
BSA	2 µl
FseI	1 µl
AsiSI	1 µl

Table 1-23 Composition of sample

PCR product	7.5 µl
Distilled water	6.5 µl
NE buffer	2 µl
BSA	2 µl
<i>FseI</i>	1 µl
<i>AsiSI</i>	1 µl

次に、得られた PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (TAKARA) の取扱説明書に準じて切り出し精製を行い、16°C で 1 晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は *E. coli* JM109 に形質転換させ、LA 寒天プレートにコロニーを形成させた。

### 1.3.9 *Bam*HI-*Pst*I 断片のクローニング

#### 1.3.9.1 エラープローン PCR

*FseI*-*AsiSI* 断片の作成時と同じく、G<sup>122</sup>Y<sup>130</sup>A<sup>36</sup>Q<sup>263</sup> 変異酵素を鋳型とし、人工核酸(8-oxo-dGTP、dPTP)を含んだ系で遺伝子の増幅を試みた。また人工核酸はその終濃度が 0.1µM、1.0µM、10µM、40µM、70µM、100µM になるように調整し、各濃度の変異ライブラリーを作成した。

Table 1-24 Sequence of cycling reaction primer

Oligonucleotides	5'→3'
FE-BamH	AACTAGTGGATCCCTACTCGCA
RE-Pst	ACTGAATTCCTGCAGAGCGTTCC

Table 1-25 Composition of PCR mixture

pSKFC4-2	1 µl
FE-BamH (10 µM)	1 µl
RE-Pst (10 µM)	1 µl
EX Taq	0.25 µl
EX Taq buffer	5 µl
dNTP Mixture	5 µl
dPTP	5 µl
8-oxo-dGTP	5 µl
Distilled water	26.75 µl
Total	50 µl

Table 1-26 PCR program

94°C		4 min
98°C	30 cycles	10 sec
55°C		30 sec
72°C		1 min
72°C		5 min

得られた PCR 産物を鋳型として、以下の条件で再び PCR を行い(PCR 条件は Table. 1-26 に同じ)、遺伝子中の人工核酸の除去を試みた。

Table 1-27 Composition of PCR mixture

PCR product (1ng/μl)	1 μl
FE-BamH(10μM)	1 μl
RE-Pst(10μM)	1 μl
EX Taq	0.25 μl
EX Taq buffer	5 μl
dNTP Mixture	5 μl
Distilled water	36.75 μl
total	50μl

#### 1.3.9.2 組み換えプラスミドの取得

上記で得られた人工核酸除去済み PCR 産物と pSKFC4-1(GYAQ)の制限酵素処理を行った。Table. 1-28 の組成で、37°Cの 3 時間の反応後、*Pst*I 消化物をエッペンチューブに移し、TE buffer を 180μl 加えた。さらに、1/10 量の酢酸ナトリウム(pH5.2)と、2.5 倍量の 100%エタノールを加え、4°Cで一晩静置後、15000rpm,4°C,30min で DNA を沈殿させた。乾燥させたサンプルを TE buffer (Table 1-30) 5μl に溶解させ *Pst*I 消化物とし、Table 1-29 の通り *Bam*HI 処理を行った。

Table 1-28 Composition of sample

pSKFC4-1, PCRproduct(400 ng/μl)	5 μl
H buffer	2 μl
<i>Pst</i> I	1 μl
Distilled water	up to 20 μl



Table 1-29 Composition of sample

<i>Pst</i> I product	5 $\mu$ l
K buffer	2 $\mu$ l
<i>Bam</i> HI	1 $\mu$ l
Distilled water	up to 20 $\mu$ l

Table 1-30 Composition of TE buffer

Tris-HCl (1M)	1ml
EDTA (0.5M)	0.2 ml
Distilled water	up to 100 ml

*Bam*HI 消化物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit(TAKARA)の取り扱い説明書に準じて切り出し精製を行い、精製した DNA 断片をインサート、ベクターとした。精製したインサートとベクターは 1:1 の濃度比で混合し、16°Cで 1 晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は *E. coli* JM109 に形質転換させ、LA 寒天プレートに大腸菌コロニーを形成させた。

### 1.3.10 シークエンス解析

#### 1.3.10.1 *Fse*I-*Asi*SI 断片の変異導入率

人工核酸濃度 100  $\mu$ M から 2 株、70  $\mu$ M から 2 株、40  $\mu$ M から 2 株、10  $\mu$ M から 5 株、5  $\mu$ M から 2 株、2 $\mu$ M から 10 株のプラスミド DNA を精製し、NylC 遺伝子を含む 1068 bp の領域について、マクロジェンジャパンにシークエンス解析を依頼した。得られた配列情報から各濃度の変異導入率を計算した。尚、配列置換が起こらなかったクローンについても、0 bp の置換遺伝子として計算し、各濃度の平均値を算出した。

#### 1.3.10.2 *Bam*HI-*Pst*I 断片の変異導入率

人工核酸濃度 100  $\mu$ M から 2 株、70  $\mu$ M から 3 株、40  $\mu$ M から 3 株、10  $\mu$ M から 3 株、1  $\mu$ M から 3 株、0.1  $\mu$ M から 4 株のプラスミド DNA を精製し、シークエンス解析を行った。1.3.10.1 同様の方法で、変異導入率を算出した。

### 1.3.11 ポリクローナル抗体の作成

タンパク質の結晶化は精製手法としても効果的であることから、ポリクローナル抗体作成のための抗原として、結晶化タンパクを使用した。HPT 製 Cryschem plate に、A280 = 38 になるまで調整した NylC-GYAQ 精製酵素と、Table 1-31、Table 1-32 にそれぞれ示す結晶化用溶媒を滴下し、Sitting drop 蒸気拡散法(Fig. 1-1)により結晶の取得を試みた。反応は 30°Cで 1 週間程度行い、

形成した結晶は、クライオループ(ループ径 0.3~0.4mm)で回収した後、20mM リン酸緩衝液で希釈したものをサンプルとして、全抗原タンパク 140mg を、ユーロフィンジェノミクス株式会社にポリクローナル抗体の作成を依頼した。

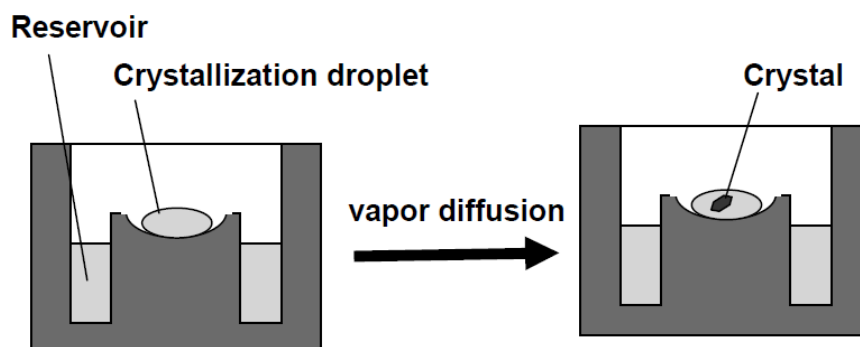


Fig. 1-1 Sitting drop vapor diffusion method.

Table 1-31 Composition of Crystallization solution 1

Tris	1.2114 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22.4502 g
Distilled water	Up to 100 ml
pH 8.5	

Table 1-32 Composition of Crystallization solution 2

HEPES	2.383 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21.1424 g
NaCl	1.1688 g
Distilled water	Up to 100 ml
pH 7.5	

### 1.3.12 ウェスタンブロット法

#### 1.3.12.1 ブロットティング

取得した変異体に対し、1.3.11 で作成したポリクローナル抗体を用いた免疫分析を行った。各種変異酵素の大腸菌破碎液を遠心し、可溶画分と、沈殿画分とに分離し、それぞれを SDS-PAGE 分析でバンドの有無を確認した。SDS-PAGE 後のタンパク質を電氣的に Poly vinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (イモビロン-P, MILLIPORE 製) にセミドライ式ブロットティング法で転写した。転写および以降の操作は、"ATTO Technical Manual ウェスタンブロットティン

グ編”に準じた。その際に使用した緩衝液の組成を Table 1-33~35 に示す。通電は 180~190 mA で 30 min 行った。

Table 1-33 Composition of blotting buffer A

Tris	7.2684 g
CH <sub>3</sub> OH	10 ml
Distilled water	Up to 200 ml

Table 1-34 Composition of blotting buffer B

Tris	0.6057 g
CH <sub>3</sub> OH	10 ml
Distilled water	Up to 200 ml

Table 1-35 Composition of blotting buffer C

Tris	0.6057 g
6-aminohexanoic acid	1.0494 g
CH <sub>3</sub> OH	10 ml
Distilled water	Up to 200 ml

### 1.3.13 免疫反応と免疫検出

ブロッキング後のメンブレンをメタノールおよび Tween-TBS (Table 1-36)で洗淨し、ブロッキング溶液(0.3% BSA を含んだ Tween-TBS)でインキュベートした後、同溶媒で 0.125 ng/ml まで希釈した抗血清を加えた。1 時間の反応後、メンブレンを洗淨し、0.0625 ng/ml まで希釈した Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)で 1 時間反応させた。反応後のメンブレンを洗淨し、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine を発色基質としてメンブレンに滴下し、30 min の反応後、メンブレンでタンパクのバンドを評価した。

Table 1-36 Composition of Tween-TBS

Tris	3.0285 g
NaCl	8.7660 g
Tween-20	1 ml
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.4	

#### 1.3.14 ELISA 法

Protein Detector ELISA Kit を用いて、ポリスチレンベースの 96well マイクロプレートにタンパク質を物理吸着させ、1.3.11 のポリクローナル抗体および、二次抗体による定量分析を行った。Coating Buffer Concentrate で 0  $\mu\text{g/ml}$ ~10  $\mu\text{g/ml}$  の範囲に調整した GYAQ 酵素の結晶化サンプル検量線作成に用いた。変異体酵素および、コントロールとして pBluescript の大腸菌破碎後の可溶画分を同 buffer で 1000 倍希釈し、プレートに室温で 1 時間吸着させた。ブロッキング、抗体反応は付属の説明書に準じた。発色基質による反応後、Crocodile Mini Workstation で 405 nm の吸光度を測定した。

#### 1.3.15 RNA 抽出

RNA の抽出は PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies) を用い、取り扱い説明書に準じて抽出を行った。OD<sub>600</sub> = 1.0 まで培養した、LB 培養液 10 ml をファルコンチューブに移し、4°C、4000 × g で 15 分間遠心分離を行った。上澄みを捨て、Lysozyme solution (Table 1-37) を 100  $\mu\text{l}$  加えて懸濁させた後、1% SDS solution を 5  $\mu\text{l}$  加えて懸濁させ、室温で 5 分間インキュベートした。その後、Lysis Buffer に 1% 2-メルカプトエタノールを加えたものを 900  $\mu\text{l}$  加え懸濁させた後、超音波破碎(30 kHz、5 分)を行った。破碎後の溶液を 12000 × g、20 °C で 2 分間遠心分離を行い、上澄みを回収した。回収した上澄みに 100%エタノールを 500  $\mu\text{l}$  加え懸濁させた後、Collection tube をつけた Spin Cartridge に懸濁液を加え 12000 × g、室温で 15 秒間遠心分離を行った。通過後の液を捨て、Wash Buffer 1 をカートリッジに 350  $\mu\text{l}$  加え、同条件で遠心分離を行った。通過後の液を捨て、DNase mixture (Table 1-38) を 80  $\mu\text{l}$  をカートリッジのメンブレン表面に加えて 15 分インキュベートした。Wash buffer 1 を 350  $\mu\text{l}$  加えて 12000 × g、室温で 15 秒間遠心分離を行った。次に、100%エタノール入り Wash Buffer 2 を 500  $\mu\text{l}$  加え、同条件で遠心分離した。この操作を 2 回行い、12000 × g、室温で 1 分間遠心分離後、RNase-free Water を 30  $\mu\text{l}$  加えて 1 分間インキュベートし、12000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、Total RNA を回収した。

Table 1-37              Composition of Lysozyme solution

Lysozyme	0.001 g
Tris	0.3 g
EDTA	0.01 g
RNase-free H <sub>2</sub> O	200 ml
pH 8.0	

Table 1-38 Composition of DNase mixture

10 ×DNase I Reaction Buffer	8 µl
Resuspended DNase (70 U/µl)	0.5 µl
RNase-free water	71.5 µl

## 1.3.16 RT-PCR

回収した Total RNA は分光光度計により 260 nm での吸光度( $A_{260}$ )から以下の式を用いて濃度を測定した。

$$\text{RNA の濃度 (ng/µl)} = 40 \times A_{260} \times \text{希釈率}$$

次に One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 2 (TaKaRa)を用いて以下の組成及び条件で逆転写反応、及び PCR 法を行った。このとき Total RNA は含有量が 20 ng となるよう希釈し、また Standard サンプルは、80、40、20、10 ng の希釈系列を用意した。

比較方法として  $\Delta Ct$  法を用いた。ある蛍光強度に達したときのサイクル数を  $Ct$  値と定義し、以下の式を用いて  $\Delta Ct$  値を求めた。また Standard サンプルの  $Ct$  値と蛍光強度から検量線を作成し、増幅効率(E)を算出した。 $\Delta Ct$  値と増幅効率 (E)から Reference サンプルに対しての遺伝子発現量を求め、比較を行った。

$$\Delta Ct = Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$E = 10^{-1/\text{傾き}}$$

$$\text{遺伝子発現量} = E^{-\Delta Ct}$$

$Ct_{\text{reference}}$  : リファレンス遺伝子(GYAQ)の  $Ct$  値

$Ct_{\text{sample}}$  : 対象遺伝子(非発現性変異体)の  $Ct$  値

Table 1-39 Composition of RT-PCR reaction mixture

2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer 4	12.5 µl
PrimeScript 1step Enzyme Mix 2	1 µl
PCR Forward Primer (10 µM)	1 µl
PCR Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Total RNA	2 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	7.5 µl

Table 1-40 RT-PCR program

42°C		5 min
95°C		10 sec
95°C	40 cycles	5 sec
60°C		30 sec

## 1.3.17 分子動力学シミュレーションを用いた変異体の挙動解析

変異体の作成には、親型 p2-NylC の座標データを基準とし、目的部位のアミノ酸の変更を行った。その後の手順は Fig.1-2 に従い、取得できた変異体酵素の座標データに対し、水素分子の付加、分子力学計算、溶媒分子(水分子)の配置、イオン座標の再配置後、20ns の分子動力学計算を行った。その後、第 2 章で示したモノマーA の Lys159 と、モノマーD の Glu115 のアミノ酸残基間の距離測定を行った。

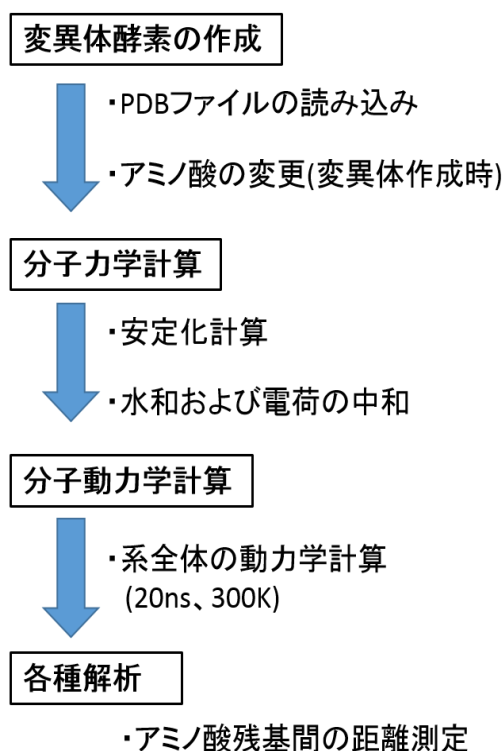


Fig. 1-2 MD simulation procedure

#### 1.4 実験結果および考察

##### 1.4.1 部位特異的変異導入法による変異酵素の構築

p2-NylC と  $G^{122}Y^{130}A^{36}Q^{263}$ (以下 GYAQ)を親型とした 122 位、137 位および 299 位の部位特異的変異導入法により変異酵素を発現する組み換えプラスミドを構築した。

塩基配列をシーケンス分析した結果、親型 p2-NylC の 122 位の Asp が Gly, Val, Lys, Arg, Pro, His, Trp に置換された 7 種類の 122 位変異体を取得した。さらに 137 位の変異導入では、計画した変異である Ala137 変異体を取得できた。また、GYAQ を親型とした 299 位の部位特異的変異導入法では、Asp299、Glu299 の 2 種類の変異体を取得した。

##### 1.4.2 各種変異酵素の精製

各種変異酵素を精製し、SDS-PAGE 分析を行った。NylC-L137A は 36kDa のバンドのみが確認でき、分断していなかった(Fig. 1-3)。p2-NylC を親型とした 122 位の変異については Gly, Val, Lys, Arg 変異酵素は 27 kDa と 9 kDa の 2 つのバンドが確認され、十分精製できていることが確認できたが、アミノ酸の種類によっては発現しないものもあった(Fig. 1-4)。Fig. 1-5 は NylC 精製工程における陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示す。Val 置換酵素では NylC に相当するピークが観察されるが、側鎖のかさ高い Trp, His, Pro 変異酵素に関しては、同じ精製段階で NylC のピークが出現しなかった。GYAQ を親型とした変異の、GYAQ-Q299D、及び GYAQ-Q299E は精製酵素を得ることはできなかった。GYAQ-Q299E について、発現チェックのため、大腸菌破碎液を SDS-PAGE に供した(Fig. 1-6)。コントロールの GYAQ(Lane 1)及び p2-NylC(Lane 4)では、27kDa と 9kDa のバンドが確認できたが、GYAQ-Q299E(Lane 3)では検出されず、ベクターのみのネガティブコントロールと同様であったことから、発現していないことが示された。

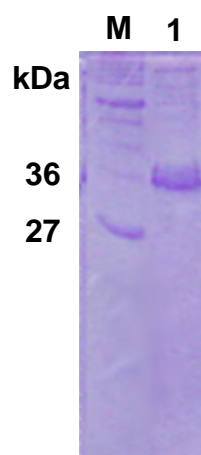


Fig. 1-3 SDS-PAGE of NylC-L137A  
Lane M: Marker, Lane 1: NylC-L137A

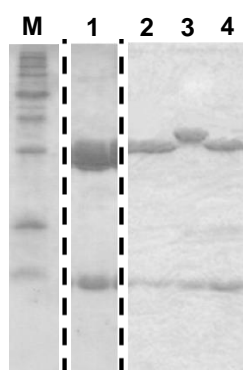


Fig. 1-4 SDS-PAGE of NylC-L137A  
Lane M: marker, Lane 1: NylC-D122G, Lane 2: NylC-D122K, Lane 3: NylC-D122R,  
Lane 4: NylC-D122V

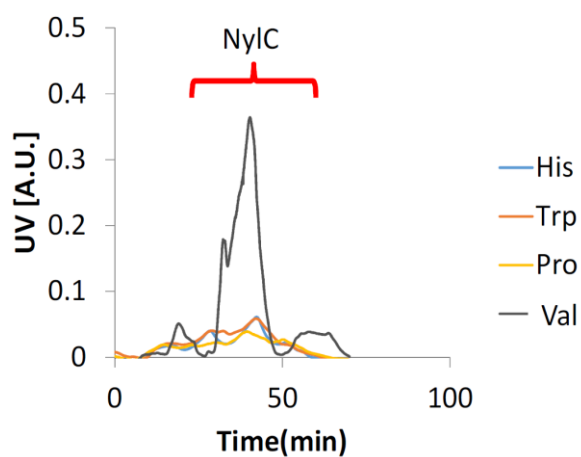


Fig. 1-5 Chromatography charts of NylCp2 mutants



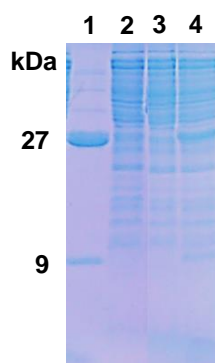


Fig. 1-6 SDS-PAGE of GYAQ-Q299E

Lane 1: Purified GYAQ, Lane 2: pBluescript SK(+), Lane 3: GYAQ-Q299E,  
Lane 4: p2-NylC

#### 1.4.3 円二色性(CD)測定

波長 220nm で昇温していったところ、ある温度付近でスペクトルが大きく変化しており、構造が変性し始めたことが確認できた。さらに昇温するとスペクトルは右肩上がりに上昇し一定まで上昇すると横這いのスペクトルとなり、全体の構造が崩れたことが確認できた。Fig. 1-7 には、122 位変異体 4 種及び、GYAQ の変性曲線を示した。各変異体の  $T_m$  値を求めると、122 位変異体に関しては、D122G が 76°C、D122V が 73°C、D122K が 69°C、D122R が 68°C、GYAQ が 88°Cを示した。また、Fig. 1-8 には 122 位変異体の X 線結晶構造からモノマーAD 界面に位置するアミノ酸残基間の距離を測定した。137 位のアミノ酸置換を施した L137A では、 $T_m$  値が大きく低下し、41°Cを示した(Fig. 1-9)。Table. 1-41 には、各種変異体の安定性特性を示した。

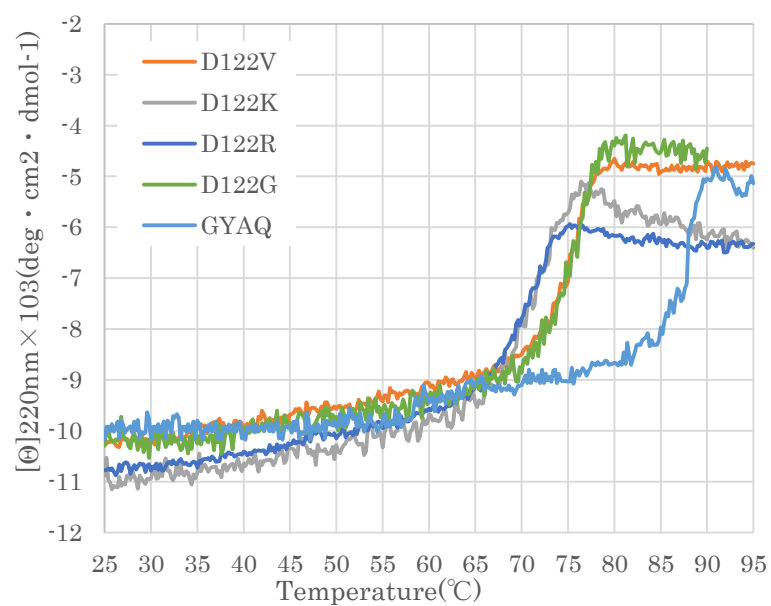


Fig. 1-7 CD spectroscopy of 122 mutants and GYAQ

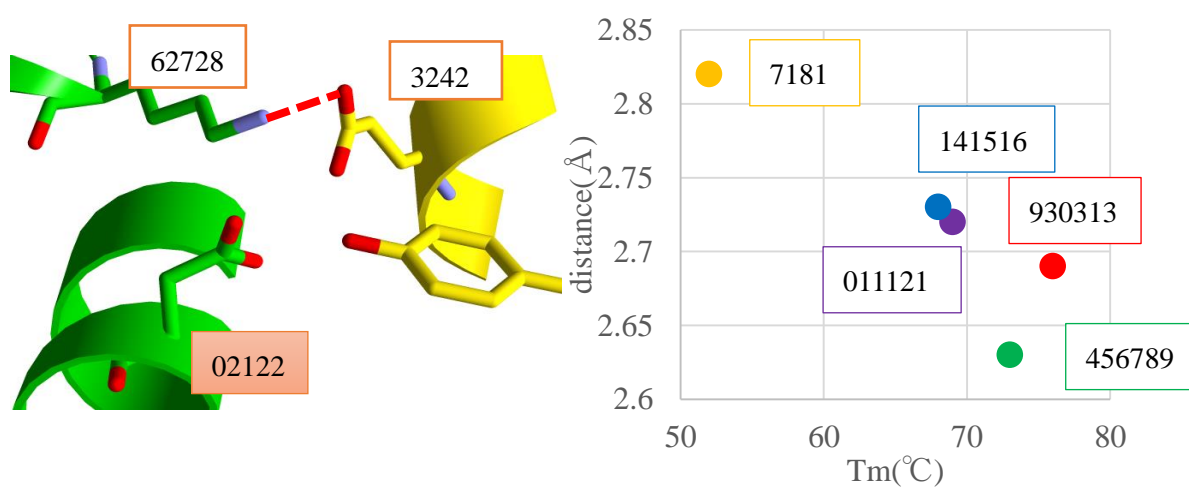


Fig. 1-8 Relation between  $T_m$  and distance from Lys<sup>159</sup> to Glu<sup>115</sup>

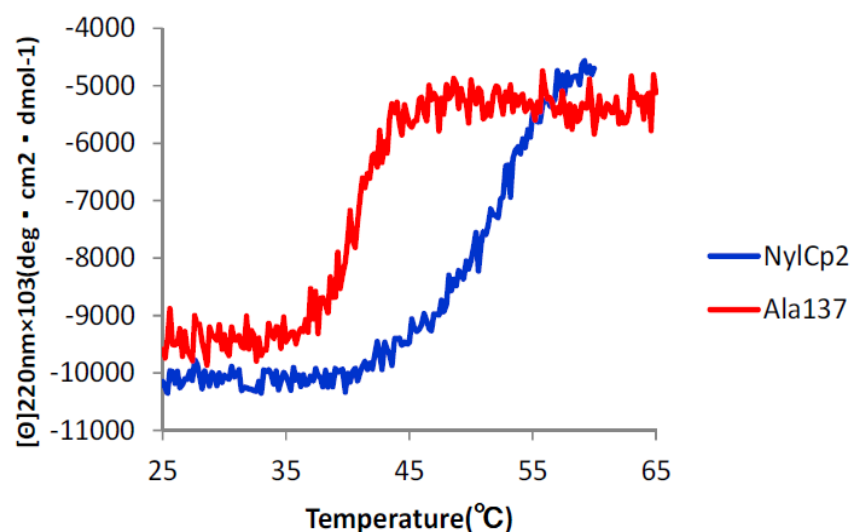


Fig. 1-9 CD spectroscopy of NylC-L137A

Table 1-41 CD measurement of NylC mutants

Enzyme	T <sub>m</sub> by CD analysis (°C)
NylCp2	52
NylC-D122G	76
NylC-D122V	73
NylC-D122K	69
NylC-D122R	68
NylC-D122P	N.E
NylC-D122H	N.E
NylC-D122W	N.E
NylC-L137A	41
G <sup>122</sup> Y <sup>130</sup> A <sup>36</sup> Q <sup>263</sup>	88
GYAQ-Q299D	N.E
GYAQ-Q299E	N.E

#### 1.4.4 超遠心分析

p2-NylC の平均分子量は約 85,000 で、2～3 量体が主に存在することが示された。1 つ 1 つのスポットに着目すると、数は少ないものの、モノマーからテトラマーの分子量に相当するものまで存在した(Fig.1-10 A)。GYAQ は平均分子量が 130,895 となり、3～4 量体が主であった。また、*T<sub>m</sub>* 値が親型 p2-NylC から 11°C 低下した NylC-L137A では、平均分子量が 1～2 量体を示していた。以

上から、NylC は自然な状態でモノマー、ダイマー、テトラマーの平衡状態にあることが明確となり、また、耐熱性の高い酵素ほどテトラマーの存在比率が高くなる傾向が示された。

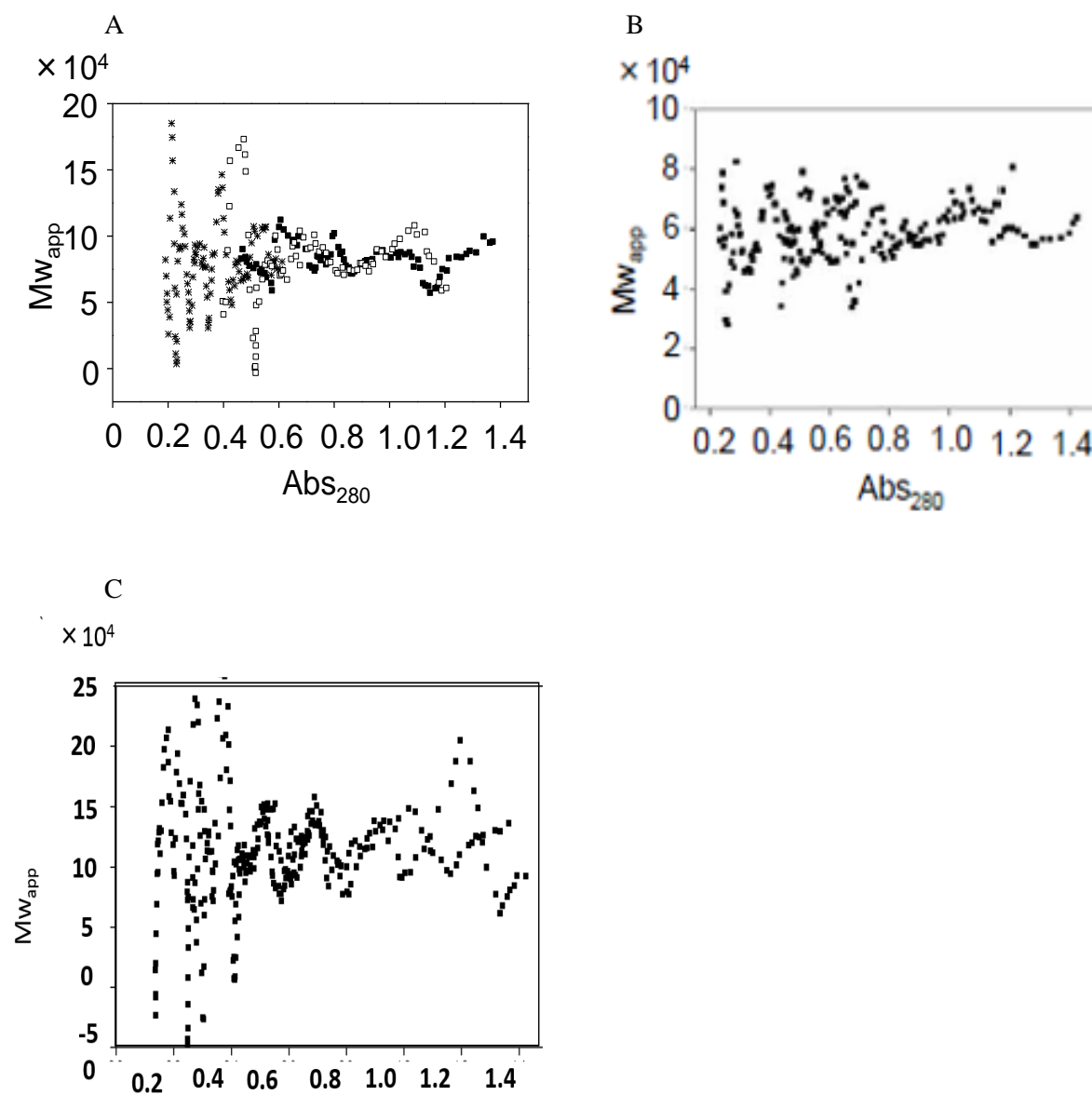


Fig. 1-10 Results of analytical ultracentrifugation.  
A: p2-NylC, B: NylC-L137A, C: GYAQ

#### 1.4.5 *FseI*-*AsiSI* 断片の変異導入率

Table 1-42 に *FseI*-*AsiSI* 断片の変異導入率を示した。人工核酸濃度の増加に伴う配列置換の増加から、核酸アナログによる変異誘発が効果的に行われていることが確認できた。

Table 1-42 Mutation efficiency (*FseI-AsiSI*)

Nucleic acid concentration	Base sequence	Amino acid sequence
100 $\mu$ M	2.90 %	6.06 %
70 $\mu$ M	1.36 %	2.25 %
40 $\mu$ M	0.37 %	0.56 %
10 $\mu$ M	0.15 %	0.39 %
5 $\mu$ M	0.05 %	0.14 %
2 $\mu$ M	0.05 %	0.14 %

1.4.6 *Bam*HI-*Pst*I 断片の変異導入率

Table 1-43 に *Bam*HI-*Pst*I 断片の変異導入率を示した。*Bam*HI-*Pst*I 断片のクローニング系においても、人工核酸濃度の増加に伴う配列置換の増加が確認できた。変異導入率も *FseI-AsiSI* 断片のクローニング系とほぼ同様の導入率が確認できた。

Table 1-43 Mutation efficiency (*Bam*HI-*Pst*I)

Nucleic acid concentration	Base sequence	Amino acid sequence
100 $\mu$ M	2.89 %	7.89 %
70 $\mu$ M	1.56 %	4.32 %
40 $\mu$ M	1.03 %	2.35 %
10 $\mu$ M	0.06 %	0.18 %
1 $\mu$ M	0.06 %	0.18 %
0.1 $\mu$ M	0.04 %	0.14 %

## 1.4.7 アミノ酸置換体の取得

Table 1-44 に *FseI-AsiSI* 断片、*Bam*HI-*Pst*I 断片の両クローニング系にて取得した 1 アミノ酸置換体を示した。また、それらの変異導入部位を Fig. 1-11 に示した。今回の変異体の導入部位は、AB 界面上に位置する部位(青丸)もあれば、分子の内部に位置する部位(黒丸)の両方が確認できた。

Table 1-44 Mutants of a few amino acid substitution

Mutants	
GYAQ-H295T	GYAQ-A179T
GYAQ-S141L	GYAQ-P157L
GYAQ-I75V	GYAQ-L106R
GYAQ-D191N	GYAQ-N235D

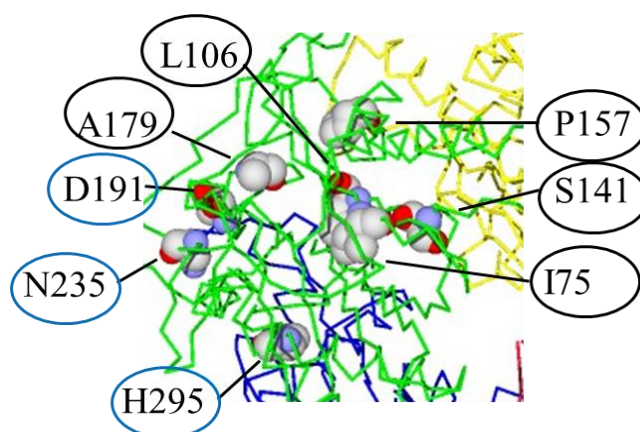


Fig. 1-11 Mutation site

#### 1.4.8 ポリクローナル抗体の作成

通常のクロマトグラフィーを用いた精製手法では、SDS-PAGE で夾雑タンパク質のバンドが観察された (Fig. 1-12 Lane 1)。ポリクローナル抗体作成のためには、純度の高い抗原が必要であるため、GYAQ 酵素の結晶化を行い、均一な精製標品の取得を試みた。上記の通り、溶媒 2 種類での結晶化を試みた結果、2 種類ともタンパクの結晶が確認できた。Fig.1-12 は結晶化前の酵素と結晶化後の酵素の SDS-PAGE 分析結果を示した。双方とも  $\alpha$  鎖 (27 kDa) と  $\beta$  鎖 (9 kDa) が確認でき、且つ結晶化後は高分子の夾雑タンパク質が除去できていた。回収した結晶は 20mM リン酸緩衝液で希釈し、ウサギへの免疫を依頼した。Fig.1-13 にウサギへの免疫前(pre)と、免疫 35 日後(1st)の抗体価のグラフを示した。1st の段階で抗体価がプラトーに達していることから全採血を依頼し、1st から 14 日後の抗血清サンプル 1mg/ml を 100ml 取得した。

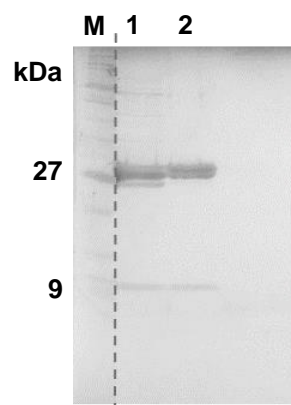


Fig. 1-12 SDS-polyacrylamide gel (17.5%) electrophoresis of proteins.  
Lane M: Marker, Lane 1: Purified GYAQ (2 mg/ml), Lane 2: Crystallized GYAQ (2 mg/ml)

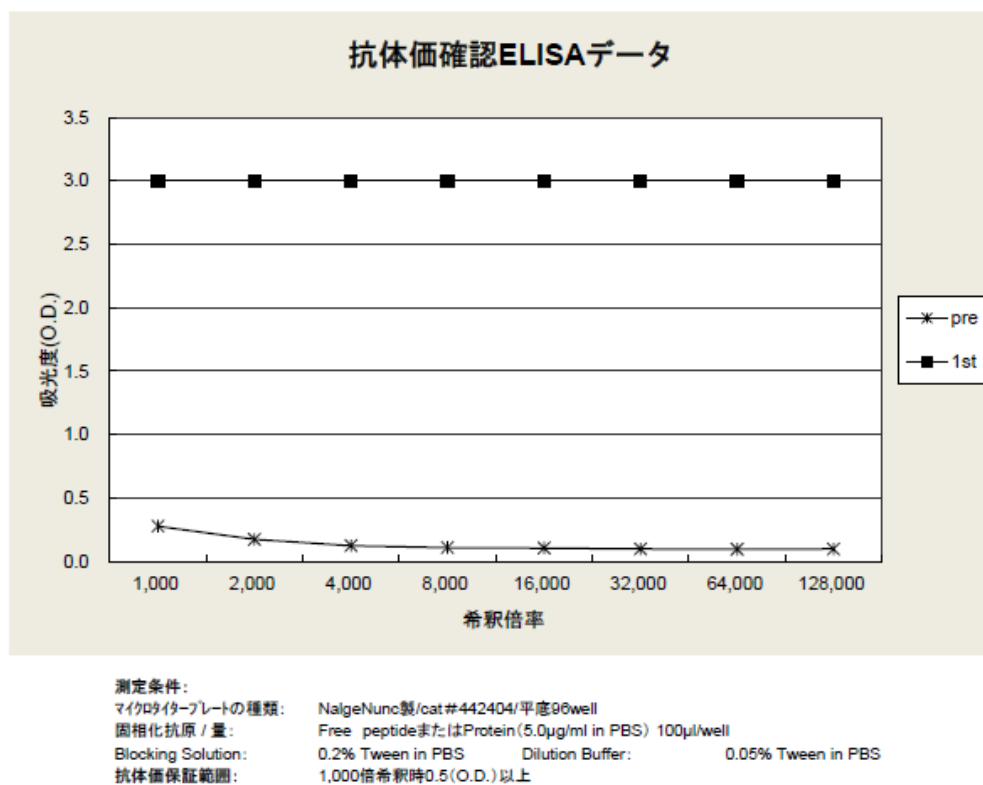


Fig. 1-13 Antibody value of ELISA method

#### 1.4.9 ウェスタンブロッティング

GYAQ の抗血清を用いたウェスタンブロット法により、変異体タンパクの検出を試みた。ブロッティングの結果、コントロールとして用いた発現性タンパクの GYAQ は、沈殿画分にはバンドは検出されなかったが、可溶画分において NylC 由来の  $\alpha$  鎖 (27kDa) と  $\beta$  鎖 (9kDa) のバンドが見られた。GYAQ と同じく、可溶画分にものみバンドが見られた変異体として、GYAQ-H295T、GYAQ-D191N の 2 つが存在した。これらはともに  $\alpha$  鎖 (27kDa) と  $\beta$  鎖 (9kDa) の活性型変異体であった。一方、GYAQ-Q299E、GYAQ-I75V、GYAQ-L106R、GYAQ-P157L、GYAQ-N235D の変異体は、沈殿画分にものみ前駆体型 (36kDa) のバンドが見られた。また、その他の NylC-D122 変異体 3 種および、GYAQ-Q299D、GYAQ-S141L は、可溶画分にも沈殿画分にもタンパクのバンドは確認できなかった。Table 1-45 には各種変異体ごとのウェスタンブロットの結果を示した。

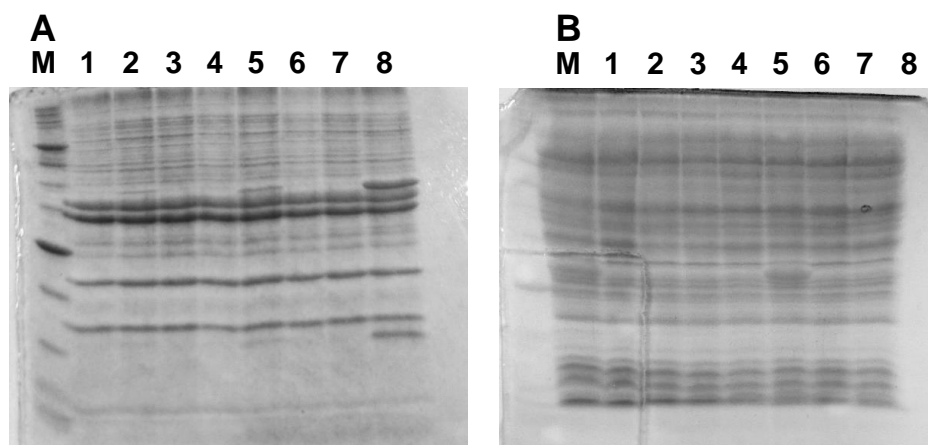


Fig. 1-14 SDS-polyacrylamide gel (17.5%) electrophoresis of proteins.

Soluble fraction (A) and Insoluble fraction (B) of cell extracts.

Lane M: Protein marker, Lane 1: GYAQ, Lane 2: NylC-D122P, Lane 3: NylC-D122H, Lane 4: NylC-D122W, Lane 5: GYAQ-A179T, Lane 6: GYAQ-H295T, Lane 7: GYAQ-Q299D, Lane 8: GYAQ-Q299E



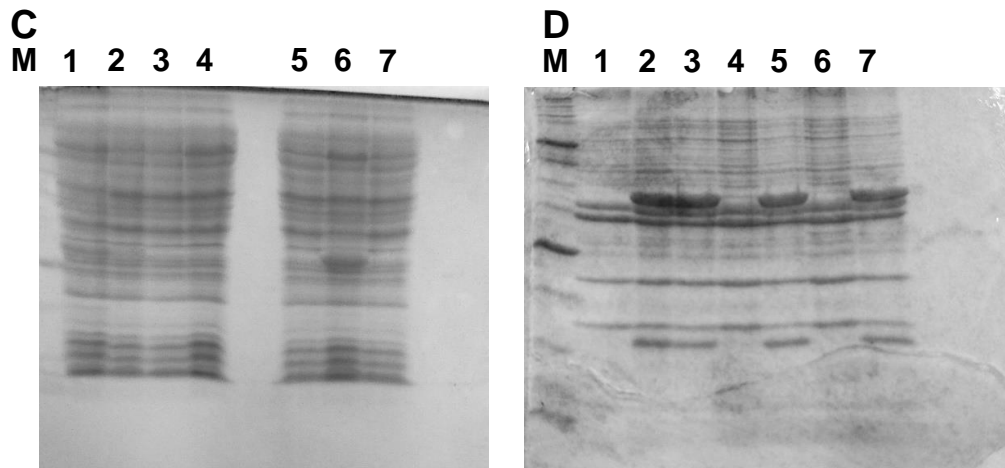


Fig. 1-15 SDS-polyacrylamide gel (17.5%) electrophoresis of proteins.

Soluble fraction (C) and Insoluble fraction (D) of cell extracts.

Lane M: Protein marker, Lane 1: GYAQ, Lane 2: GYAQ-I75V, Lane 3: GYAQ-L106R, Lane 4: GYAQ-S141L, Lane 5: GYAQ-P157L, Lane 6: GYAQ-D191N, Lane 7: GYAQ-N235D

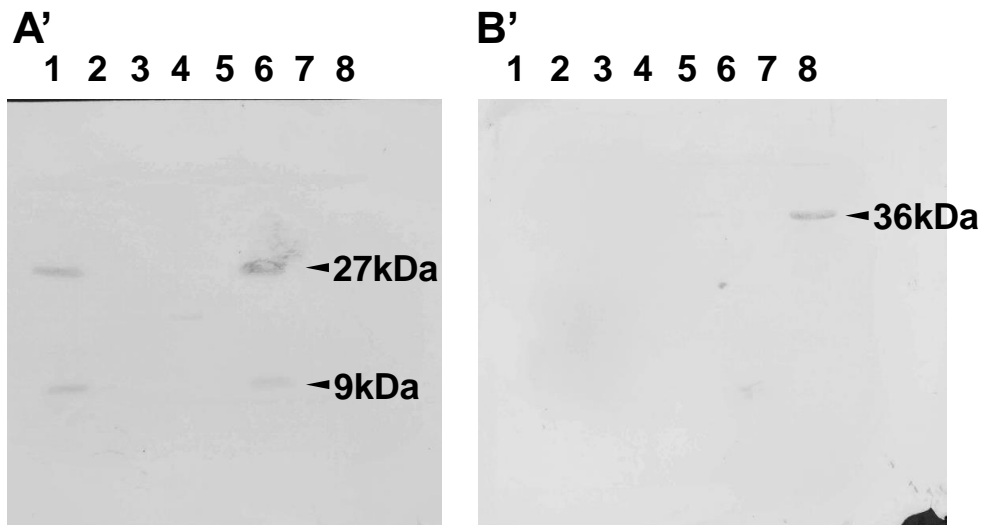


Fig. 1-16 Western blotting of protein.

Soluble fraction (A) and insoluble fraction (B) of SDS-PAGE were transferred to PVDF as soluble fraction membrane (A') and insoluble fraction membrane (B').

Lane M: Protein marker, Lane 1: GYAQ, Lane 2: NylC-D122P, Lane 3: NylC-D122H, Lane 4: NylC-D122W, Lane 5: GYAQ-A179T, Lane 6: GYAQ-H295T, Lane 7: GYAQ-Q299D, Lane 8: GYAQ-Q299E

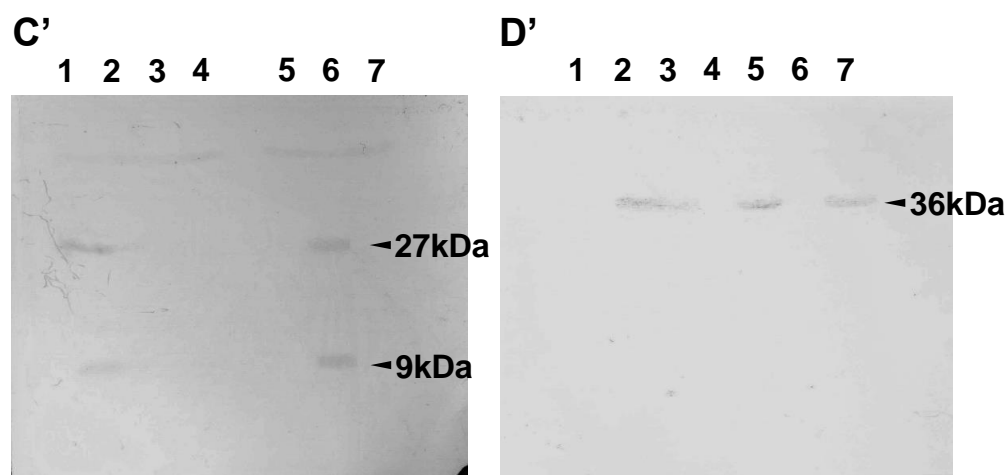


Fig. 1-17 Western blotting of protein.

Soluble fraction (C) and insoluble fraction (D) of SDS-PAGE were transferred to PVDF as soluble fraction membrane (C') and insoluble fraction membrane (D').

Lane M: Protein marker, Lane 1: GYAQ, Lane 2: GYAQ-I75V, Lane 3: GYAQ-L106R, Lane 4: GYAQ-S141L, Lane 5: GYAQ-P157L, Lane 6: GYAQ-D191N, Lane 7: GYAQ-N235D

Table 1-45 Result of Western blotting

Enzyme	WS (可溶画分)	WS (沈殿画分)
GYAQ	27k, 9k	-
NylC-D122P	-	-
NylC-D122H	-	-
NylC-D122W	-	-
GYAQ-A179T	-	-
GYAQ-H295T	27k, 9k	-
GYAQ-Q299D	-	-
GYAQ-Q299E	-	36k
GYAQ-I75V	-	36k
GYAQ-L106R	-	36k
GYAQ-S141L	-	-
GYAQ-P157L	-	36k
GYAQ-D191N	27k, 9k	-
GYAQ-N235D	-	36k

#### 1.4.10 ELISA

1.4.9 の変異酵素に対し、ポリスチレンプレートでの直接吸着法で、タンパクの定量分析を行った。Fig. 1-18 に各種変異体の吸着タンパク量を示した。1.4.9 のウエスタンブロットの結果より、可溶画分に  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が見られた GYAQ、GYAQ-H295T、GYAQ-D191N の 3 種は、発現タンパクであることがわかるような高い数値を示した。一方、GYAQ-A179T、GYAQ-Q299E、GYAQ-N235D はそれぞれウエスタンブロットの可溶画分にはバンドが確認できなかったが、ELISA 法によって GYAQ と近いタンパク量を示すことから、低分子のフラグメントのタンパクとして、可溶画分に発現している可能性がある。またその他の NylC-122 位変異体 3 種、GYAQ-Q299D、GYAQ-I75V、GYAQ-L106R、GYAQ-S141L、GYAQ-P157L に関しては、数値が GYAQ に比べ半分以下を示すことから、同じく低分子のフラグメントかもしくは、タンパク自体が発現していない可能性がある変異体と考察した。Table 1-46 に各種変異体における免疫分析の結果を示した。

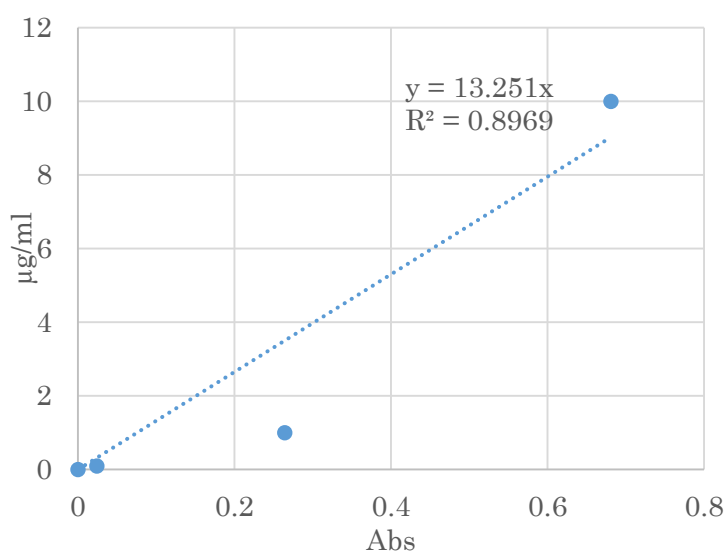


Fig. 1-18 Calibration curve of crystallized GYAQ.

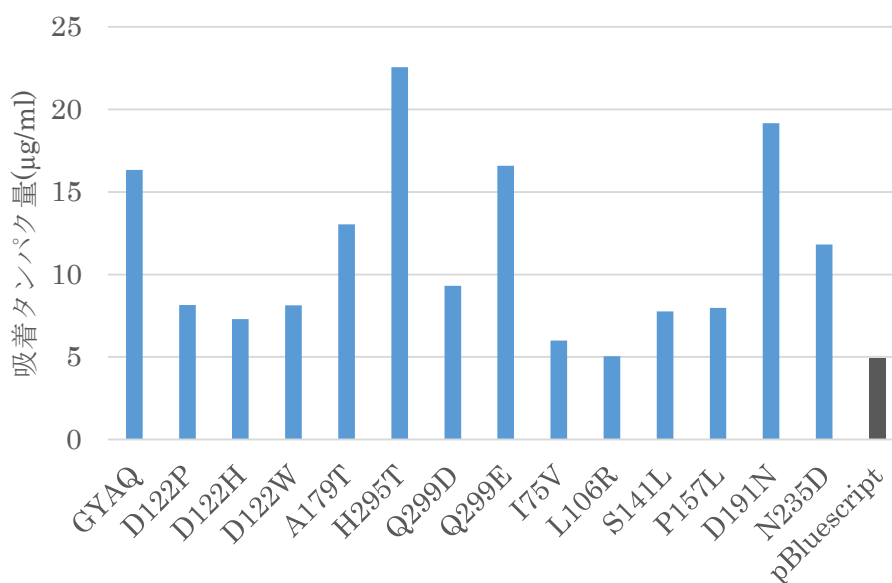


Fig. 1-19 Quantitative analysis of the adsorbed protein.

Table 1-46 Result of immune assay

Enzyme	WS (可溶画分)	WS (沈殿画分)	ELISA 法 (μg/ml)	RT-PCR (%)
GYAQ	27k, 9k	-	16.3	100
NylC-D122P	-	-	8.15	129
NylC-D122H	-	-	7.29	142
NylC-D122W	-	-	8.14	112
GYAQ-A179T	-	-	13.0	121
GYAQ-H295T	27k, 9k	-	22.6	113
GYAQ-Q299D	-	-	9.32	154
GYAQ-Q299E	-	36k	16.6	106
GYAQ-I75V	-	36k	5.99	120
GYAQ-L106R	-	36k	5.05	118
GYAQ-S141L	-	-	7.77	124
GYAQ-P157L	-	36k	7.96	96.1
GYAQ-D191N	27k, 9k	-	19.2	121
GYAQ-N235D	-	36k	11.8	67.1
pBluescript	-	-	4.93	-

#### 1.4.11 RT-PCR

RNA の非発現への影響を確認するため、変異体から抽出した RNA を用いた RT-PCR を行い、得られた増幅曲線から  $\Delta C_t$  値と遺伝子発現量を求めた。

Fig.1-20 には GYAQ の遺伝子発現量を 100%としたときの変異体の相対比を示した。変異体間で多少の差はあるが、遺伝子増幅が全く起こらないことはなかったため、mRNA は正常に合成していると判断した。

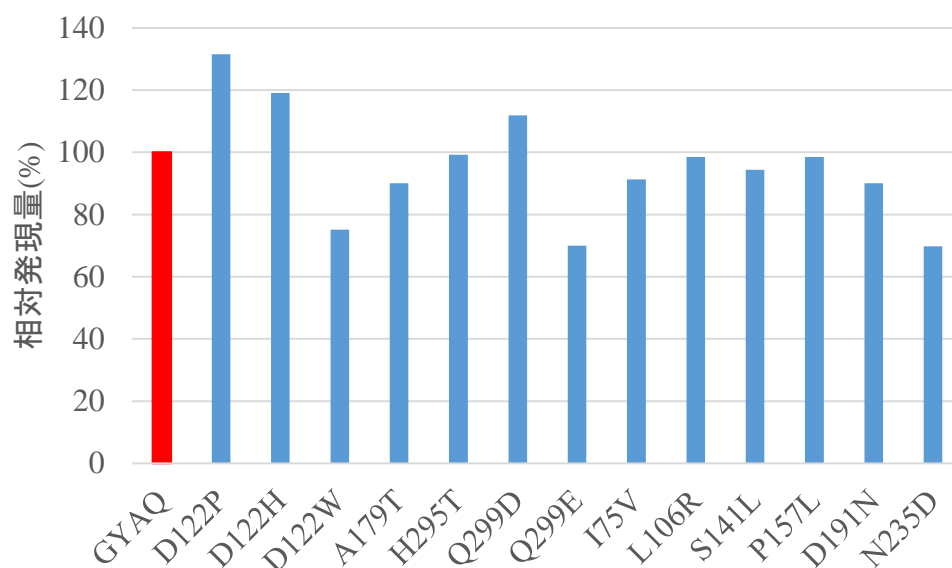


Fig. 1-20 Relative value of gene expression.

#### 1.4.12 分子動力学シミュレーションを用いた変異体の挙動解析(アミノ酸残基間距離測定)

残基間距離測定の有効性の確認のため、AD サブユニットに位置するアミノ酸残基間距離の測定を行った。Fig. 1-21 には X 線結晶構造からの実測値および、Fig. 1-22 には MD シミュレーションを用いた推測値を示す。Fig. 1-21 のグラフで見られた  $T_m$  値の上昇に伴う、残基間距離が減少していく傾向が Fig. 1-22 でも再現できたため、MD シミュレーションの距離計算の有効性を示すことができた。

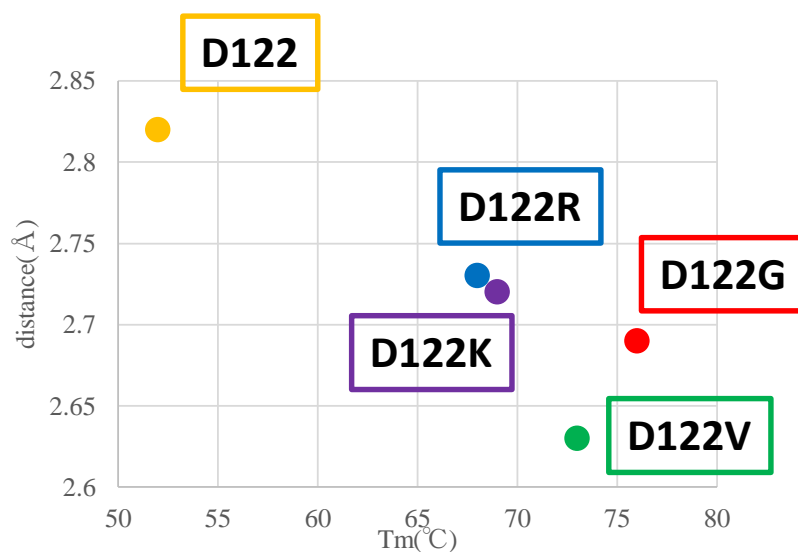


Fig. 1-21 Relative value of gene expression.

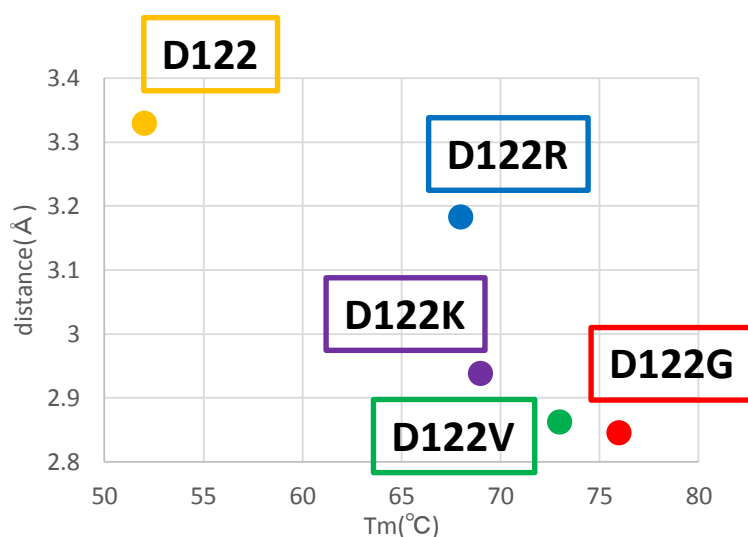


Fig. 1-22 Estimated values of the MD simulation

#### 1.4.13 分子動力学シミュレーションを用いた変異体の挙動解析(残基間距離の経時変化)

1.4.12 にて残基間距離計算の信頼性を示すことができたことから、変異体の会合状態の挙動を解析した。親型 GYAQ および、GYAQ-Q299D, GYAQ-Q299E の会合状態まとめを Table 1-47 に示し、また変異体ごとの残基間距離の経時変化を示した(それぞれ Fig. 1-23~25)。299 位変異体は、同じ酸性アミノ酸置換体であるにも関わらず、別の挙動をとることが確認できた。これらの変異体の残基間距離の経時変化を見ると、フラグメントのみ生成する GYAQ-Q299D

は、距離の不規則なパルスが他と比べて多数存在することがわかった(Fig. 1-25)。

Table 1-47 Association state of mutants

Enzyme	Association state
GYAQ	活性型
GYAQ-Q299D	フラグメント
GYAQ-Q299E	凝集体

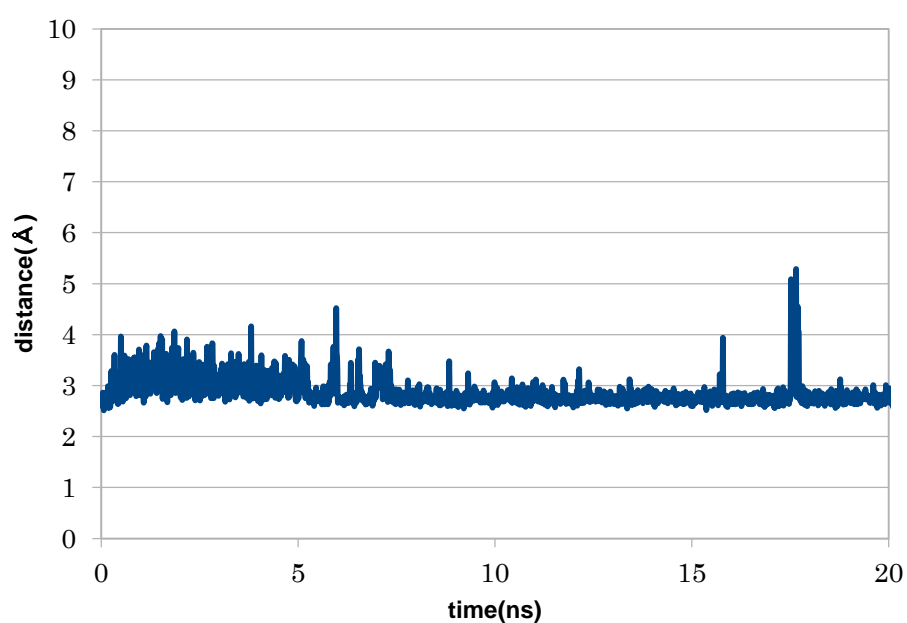


Fig. 1-23 Distance from Lys159 to Glu115 of GYAQ

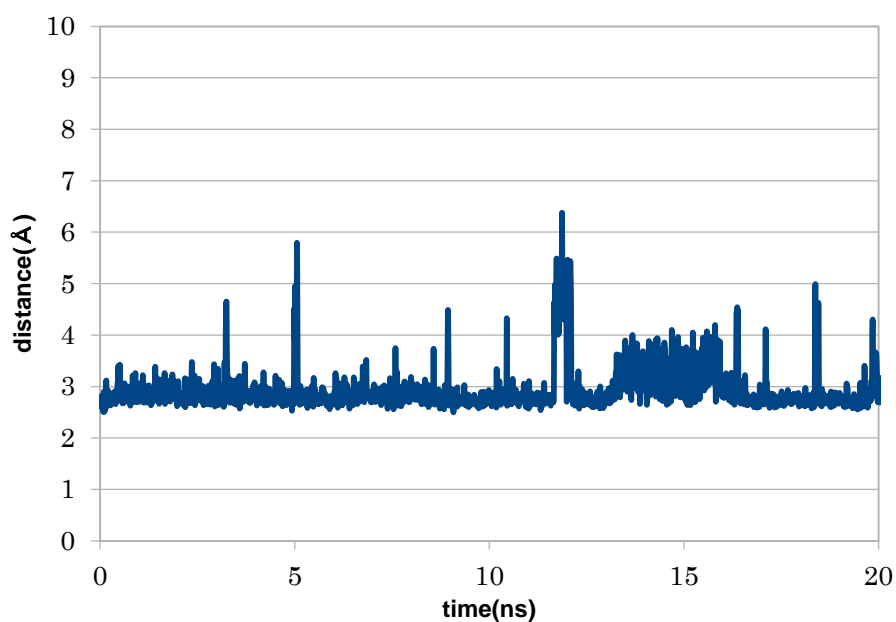


Fig. 1-24 Distance from Lys159 to Glu115 of GYAQ-Q299D

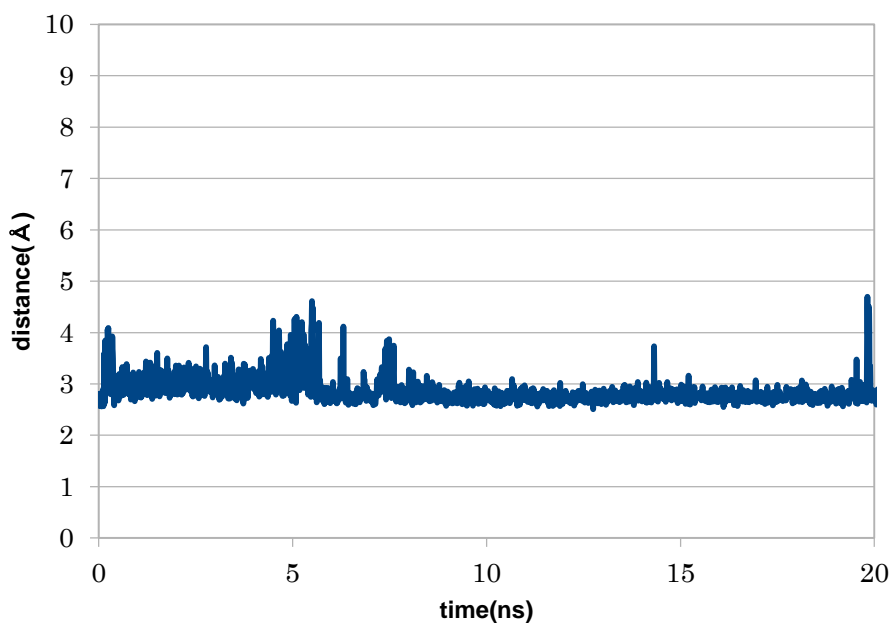


Fig. 1-25 Distance from Lys159 to Glu115 of GYAQ-Q299E

## 1.5 結論

本章では、NylC のアミノ酸置換と熱安定性との関係について解明するため、p2-NylC の界面にアミノ酸置換を施し、熱安定性と構造形成能から議論した。122 位変異体より、AD 界面状に位置する 122 位は熱安定性に大きく影響していることがわかった。一方で、Pro122, His122, Trp122 や、GYAQ-Q299D, GYAQ-Q299E などは不安定型の挙動をとり、タンパクとして取得できなかった。



た。また、超遠心実験(沈降平衡法)により、ネイティブな状態の NyIC が、モノマー、ダイマー、及びテトラマーの平衡状態をとることが示された。加えて、耐熱性の高い酵素ほどテトラマーの割合が高い傾向となり、熱安定性とテトラマー形成との関係が明確となった。以上の内容を NyIC の自然状態における模式図として Fig. 1-26 に示す。

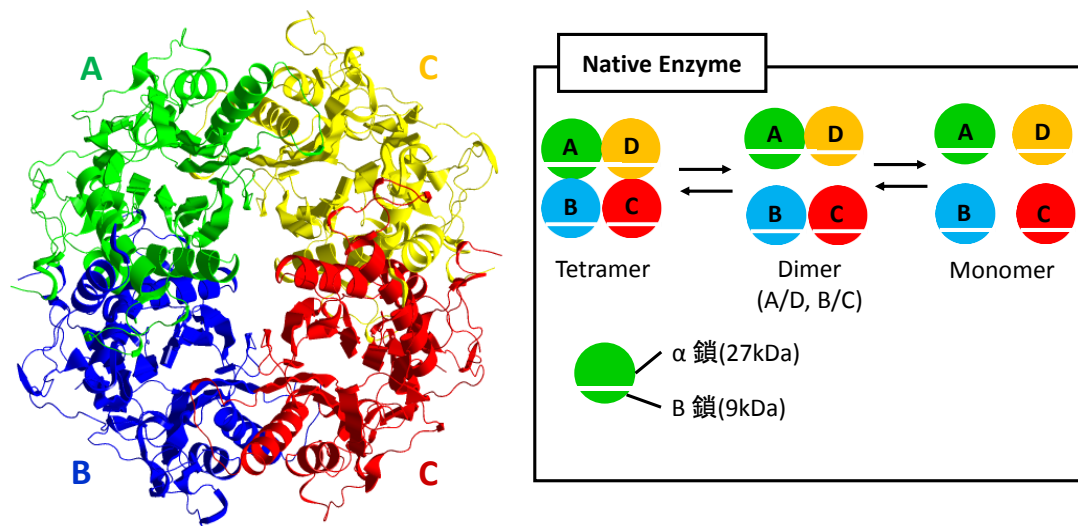


Fig. 1-26 NyIC の自然状態におけるサブユニット会合

また、変異体解析のために、核酸アナログを用いたランダム変異導入法による変異体取得を試みた。*FseI*-*AsiSI* サイト、*BamHI*-*PstI* サイトの2種類のクローニングサイトによる組み換え遺伝子を作成したところ、両クローニングサイトにおける変異導入率にて、効果的に遺伝子置換が起こった。両サイトから、1アミノ酸置換体のみの変異部位を確認したところ、界面部位もあれば、分子内部に存在する変異体も存在した。また、今回変異ライブラリーを構築できたことで、さらなる変異体の解析を進めていく。

そして、取得した変異体の細胞内局在性と分子量を調べるため、ウェスタンブロット法、ELISA 法による免疫分析および、遺伝子発現を調べるための RT-PCR を行った。RT-PCR において、極端な発現量の低下が見られなかったことからアミノ酸置換による遺伝子発現の影響は見られなかった。一方、免疫分析の結果、会合状態が異なる変異体が多く存在することがわかった。変異体をその会合状態における分類をしたところ、1) 可溶画分に活性型として存在、2) 可溶画分に前駆体型として存在、3) 沈殿画分に前駆体型として存在、4) フラグメントのみが可溶画分に存在、の4種類に分かれた。またこれらの会合状態のモデル図を Fig. 1-27 に示した。1)は、NyIC の自然な状態から、溶

液中にテトラマーからモノマーの状態が存在することが推測できる。2)に該当するものは、今回取得できなかったが、これまでの研究で、前駆体型として存在する変異体が多数存在することがわかっている。3)は、前駆体として発現した後、モノマー間の不適切な会合により、不溶性の凝集体として存在することが推測できる。4)の状態は、4つのグループの中で最もタンパクが不安定なため、細胞内でタンパク分解酵素による分解が進み、フラグメントのみが存在する状態になったと推測している。

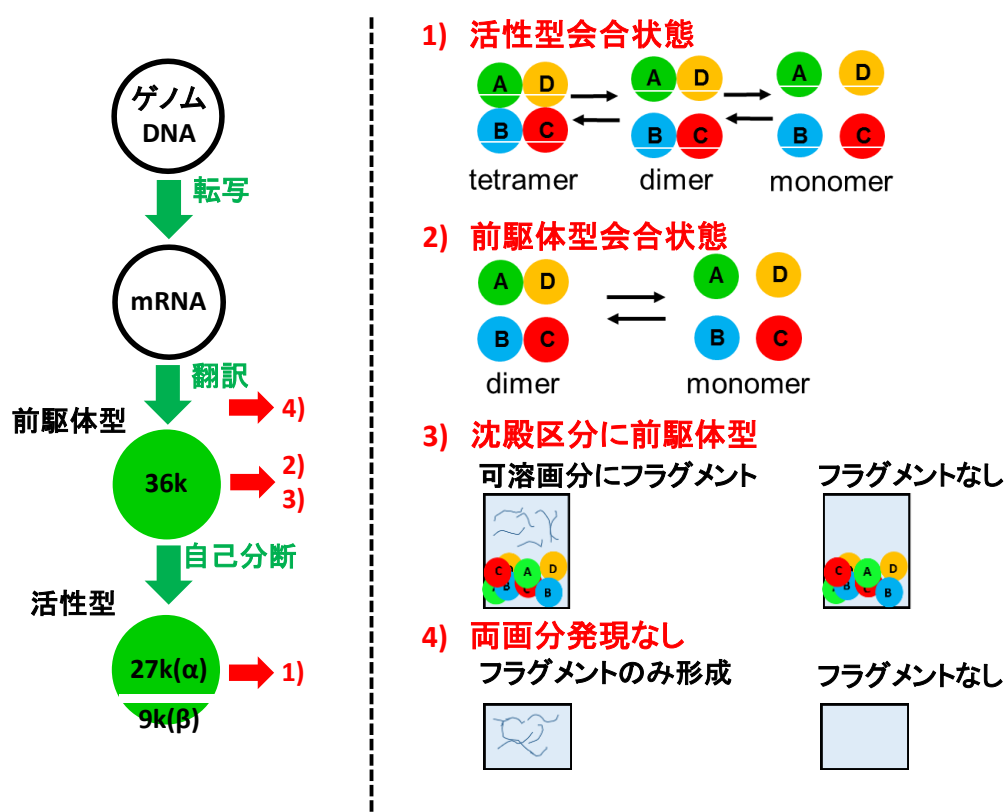


Fig. 1-27 Subcellular localization

最後に、MD シミュレーションを用いて、NylC 変異体の挙動解析を行った。AD サブユニット間の残基間距離を解析したところ、耐熱性の向上に伴い、残基間距離が近接していく傾向が MD でも再現することができた。ここで、GYAQ を含む変異体 3 種に対して、同様のアミノ酸残基間距離の経時変化を示したところ、フラグメント生成する変異体には、不規則なパルスが多数存在することが確認できた。よって、フラグメント形成の要因として、サブユニット間の不安定化から、タンパク全体の不安定化につながり、フラグメント形成に影響したと考察している。

## 参考文献

- 1) 永井圭介：立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の機能開発と応用：博士論文 (2014).
- 2) 大島祥平：ナイロン加水分解酵素(NylC)の自己分断機構の解明：修士論文 (2013).
- 3) 田中優佑：ナイロンオリゴマー分解酵素(NylC)の高度耐熱化とナイロン分解への応用 (2012).
- 4) Negoro, S., N. Shibata, Y. Tanaka, K. Yasuhira, Y. H. Shibata, H. Hashimoto, and Y. Lee. The three-dimensional structure of nylon hydrolase and the mechanism of nylon-6 hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 287: 5079-5090 (2012).
- 5) 三田隆二、田中優佑：p2-NylC における 122 番目のアミノ酸残基の部位特異的ランダム変異法による耐熱化：中間報告 (2010).
- 6) Petrie KL, Joyce GF. Deep sequencing analysis of mutations resulting from the incorporation of dNTP analogs. *N. acid. Res.* 22 8095-8104 (2012).
- 7) 安平健吾：好アルカリ性細菌の生産するナイロンオリゴマー分解酵素の立体構造解析及びアミド合成への応用：博士論文 (2007).
- 8) 橋本悠：ナイロンオリゴマー分解酵素(EIII)の触媒機能と熱安定性について：卒業論文 (2009).
- 9) GE imagination at work: <http://www.gelifesciences.co.jp>
- 10) K. Kamiya, T. Baba, M Boero. Nylon-oligomer Hydrolase Promoting Cleavage Reactions in Unnatural Amide Compounds. *J. Phys. Chem.* 5: 1210-1216 (2014)

## 第2章

### 有機溶媒中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能の解析

#### 2.1 諸言

タンパク質は通常水溶液中で水分子との水素結合を通じて特有のフォールディングを維持するなど、安定性を保っている。したがってそれら水分子との相互作用に介入する有機溶媒がタンパク質にもたらす影響は、タンパク質にとって決して小さくない。実際にアセトンやエタノールといった有機溶媒によってタンパク質は容易に変性してしまう。一方でグリセロールのように、タンパク質の安定化に寄与するものも存在する。その中で我々はナイロンのリサイクルの工業プロセスでエチレングリコール(EG)が用いられていることに着目した。

本章では耐熱性の異なる種々の変異体について、EG 中の 6 ナイロンと Aco 分解活性を測定するとともに、CD 波長スペクトルから 2 次構造を予測した(BeStSel 法: PNAS, 112, E3095, 2015; Fig. 2-1)。有機溶媒による安定化機構が解明できれば、より安定化効果の高い有機溶媒の選定や有機溶媒中で安定性の高い変異体作成が行いやすくなると期待できる。

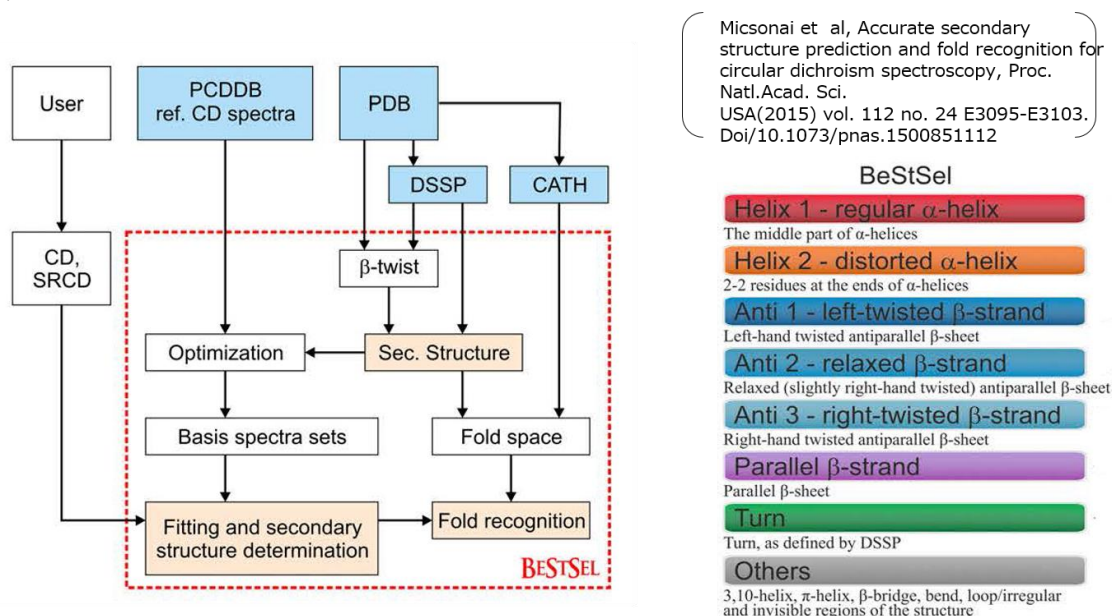


Fig. 2-1 Overview of BeStSel program

- 2.2 実験材料
  - 2.2.1 使用菌体およびプラスミド  
第 1 章に準じた。
  - 2.2.2 使用機器  
第 1 章に準じた。
  - 2.2.3 使用培地  
第 1 章に準じた。
- 2.3 実験方法
  - 2.3.1 各種変異酵素の精製  
1.3.3 に準じた。
  - 2.3.2 タンパク質濃度の測定  
1.3.5 に準じた。
  - 2.3.3 円二色性(CD)測定  
1.3.6 に準じた。
  - 2.3.4 二次構造予測  
CD スペクトルにより得られた結果を、BeStSel 構造予測プログラム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, E3095, 2015)に入力し、二次構造を推定した。
  - 2.3.5 ナイロン加水分解活性測定
    - 2.3.5.1 基質調製  
オイルバスを用いて 160°C で 40mg/ml の濃度になるよう、6 ナイロンをエチレングリコールに攪拌しながら分散させたものを基質とした。
    - 2.3.5.2 酵素反応  
酵素反応は、2.3.5.1 で調製した基質を終濃度 5mg/ml になるように用い、エチレングリコールを 0~99%(10%刻み)で 900ml 分注したものに酵素溶液を 100  $\mu$ l(終濃度 0.1mg/ml) 加え、48°C、1 時間で行った。その後、経時的に反応溶液の上清 60  $\mu$ l をサンプリングし、回収したサンプルは直ちに加熱し、酵素活性を失活させた。
    - 2.3.5.3 トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法による分解産物の定量  
2.3.5.2 で得たサンプル溶液に 0.1 M 四ホウ酸ナトリウム水溶液を 750  $\mu$ l (pH

8.0)及び TNBS (Table 2-1)溶液を 300  $\mu$ l 加えて、40°Cで 60 分間保温し発色させた。60 分後、得られたサンプルの 420 nm の吸光度を測定し、既知濃度の Ahx の吸光度と比較し、分解産物の定量を行った。

Table 2-1                      Composition of TNBS solution

TNBS	0.015 g
Sodium sulfite	0.0195 g
water	30 ml
Total	30 ml

#### 2.3.6      Aco 加水分解活性測定

酵素反応は、基質 4mg にエチレングリコールを 0~99%(10%刻み)で 900ml 分注し、懸濁したものに酵素溶液を 100  $\mu$ l 加え、37°C、1 時間で行った。その後経時的に反応溶液の上清 60  $\mu$ l をサンプリングし、回収したサンプルは直ちに加熱し、酵素活性を失活させた。得られたサンプルを 2.3.5.2 の方法に準じて分析した。

## 2.4 実験結果および考察

### 2.4.1 エチレングリコール中での NylC の酵素反応

水溶液中に比べ、EG 濃度が 20%あたりまでは分解産物の上昇が見られたが、それ以降は EG 濃度が上昇するほど分解産物は減少していった(Fig. 2-2~3)。また、分解産物の生成は水溶液中およびエチレングリコール添加反応液中でも、反応開始後 24 時間で停止していた。

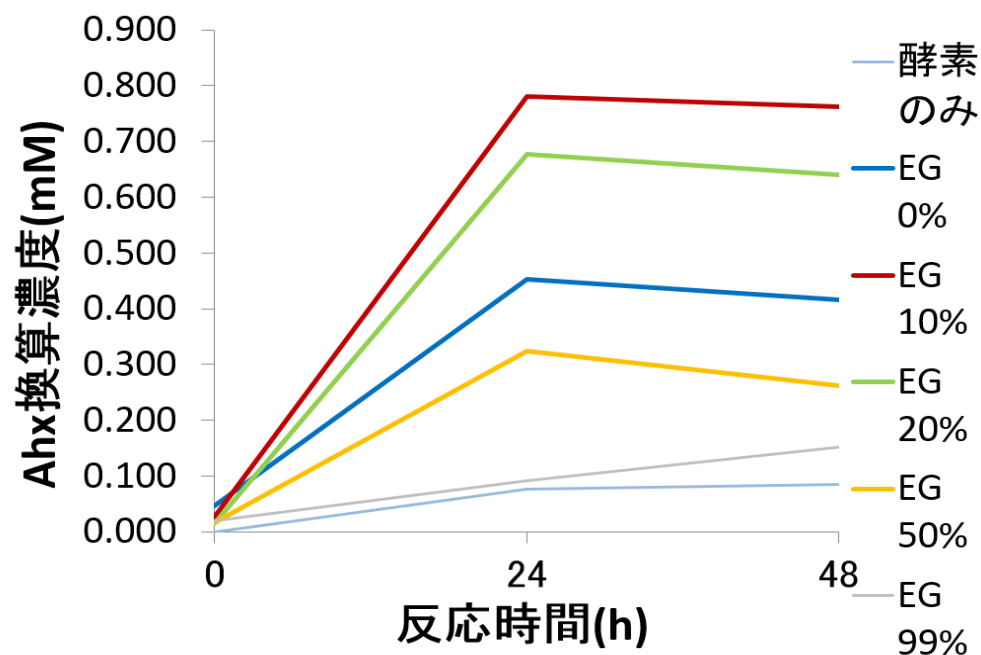


Fig. 2-2 Time course of degradative product

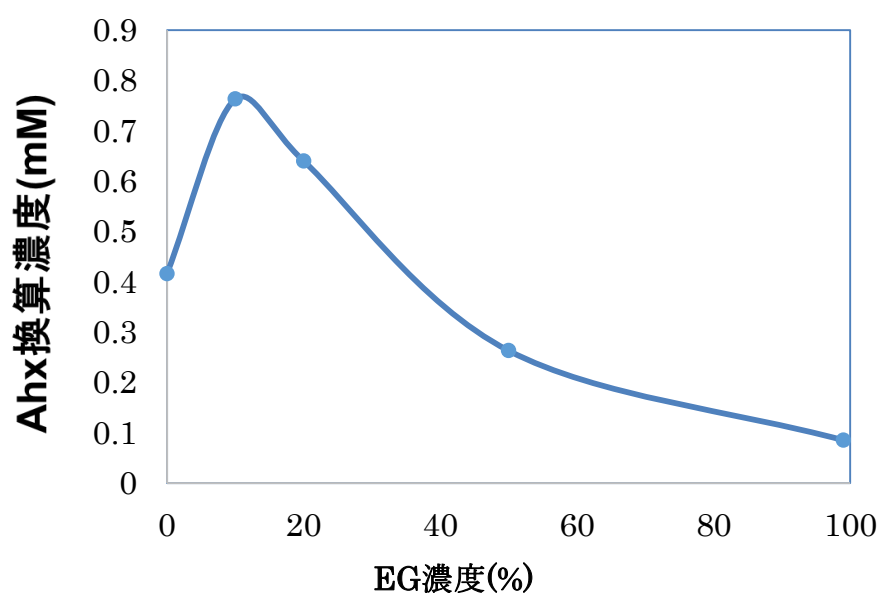


Fig. 2-3 Degradative activity in a variety of EG concentration

#### 2.4.2 EG 中における NylC の円二色性(CD)測定

水溶液中および 50%エチレングリコール中における NylC の温度変化を伴った CD スペクトルを測定したところ、水溶液中では GYAQ の  $T_m$  値が 90°C 付近であったが、エチレングリコール中では  $T_m$  値が 70°C 付近まで下降していた (Fig. 2-4)。

また、50%エチレングリコール中で GYAQ の 25°C および 95°C 加熱後の CD スペクトルを比較すると、大きなスペクトルの変化が見られ、95°C エチレングリコール中で GYAQ は完全に変性していることがわかった。加熱後に再び 25°C に冷却し CD スペクトルを測定した結果、加熱前に近いスペクトルが観測された (Fig. 2-5)。

次に、GYAQ を用いて、エチレングリコール濃度を 0~99% まで変化させ、その CD スペクトルを観測した。その結果、EG 濃度が高くなるにつれてスペクトルのピークが長波長側へシフトしていることが確認された (Fig. 2-6)。一方で、親型酵素である p2-NylC では EG 濃度を変化させても顕著なピークのシフトは確認できなかった (Fig. 2-7)。

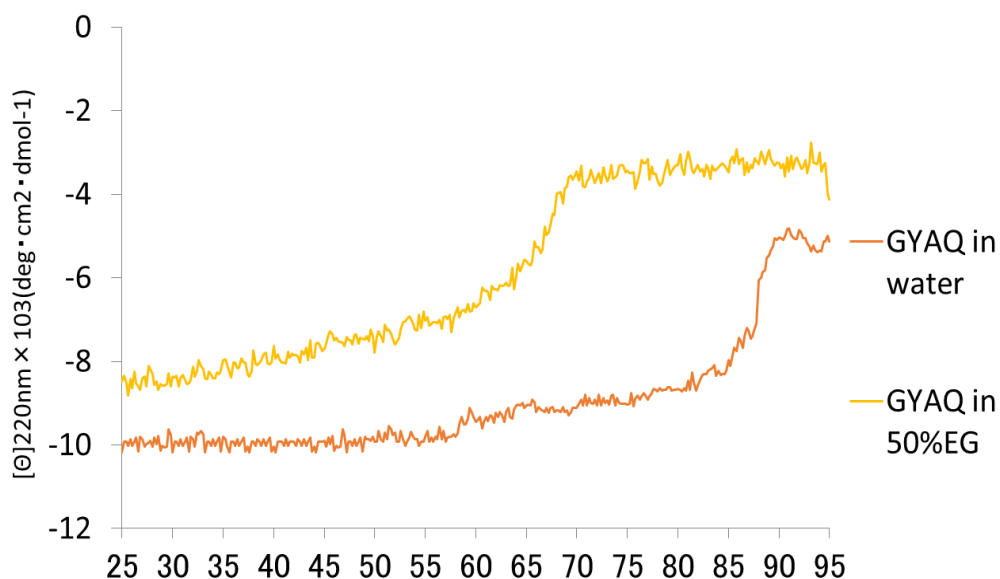
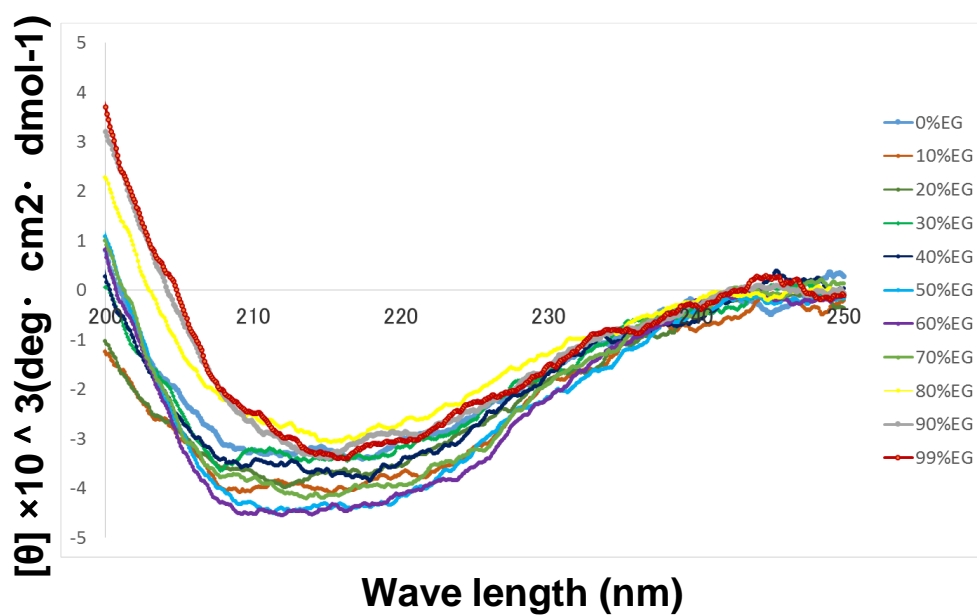
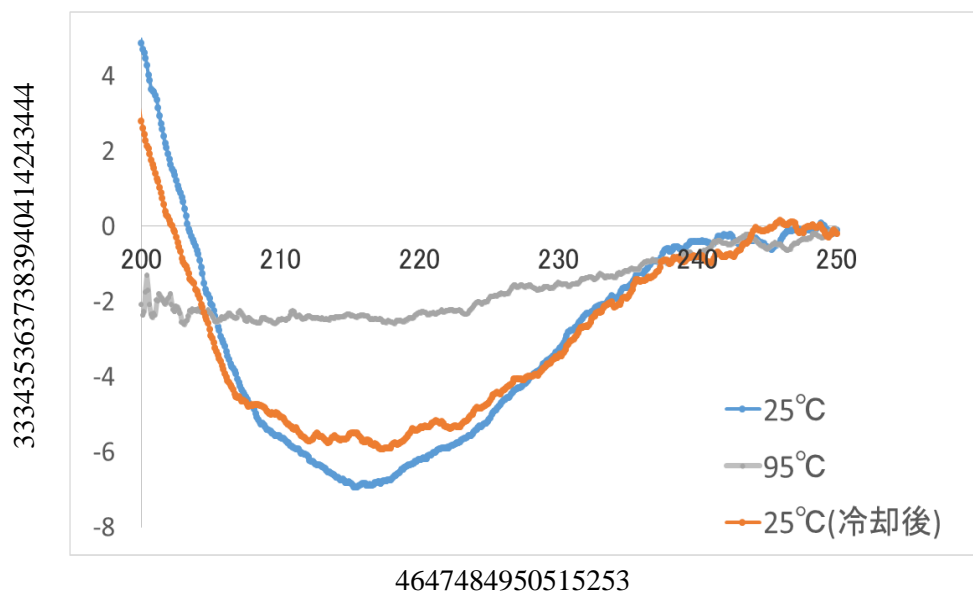


Fig. 2-4 CD spectroscopy of GYAQ (Change in EG concentration 1)





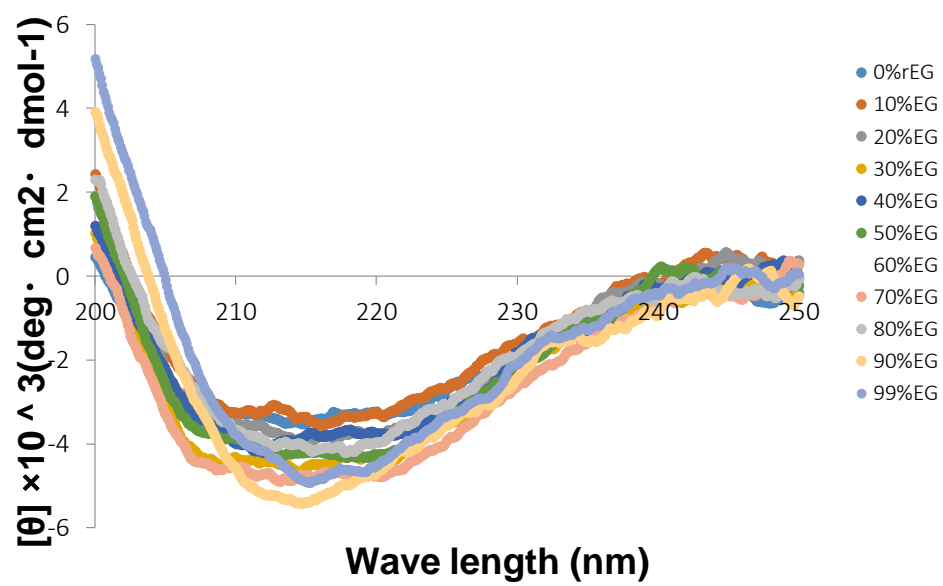


Fig. 2-7 CD spectroscopy of p2-NylC (Change in EG concentration)

### 2.4.3 EG 中における NylC の二次構造予測

2.4.2 の EG 濃度を変化させた際のスペクトルデータを用いて、BeStSel 構造予測プログラムにより p2-NylC および GYAQ の二次構造の変化を予測した。親型酵素である p2-NylC では顕著な二次構造の変化は見られなかった(Table 2-2, Fig. 2-8)。一方で、GYAQ では EG 濃度が上昇するに従い、Helix 構造の増加が確認された。また、Helix 構造の上昇に伴い、比活性の減少も確認された (Table 2-3, Fig. 2-9)。

Table 2-2 Ratio of secondary structure of p2-NylC

EG Concentration (%)		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99
Helix	Helix 1	18.4	16.1	14.8	16.1	14.7	15.2	11.0	9.6	18.8	15.5	15.1
	Helix 2	9.5	1.5	9.4	11.8	12.4	5.2	12.3	12.6	0.0	9.5	20.4
Sheet	Anti 1	2.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.1
	Anti 2	7.7	14.9	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.4	0.2	0.0
	Anti 3	8.3	10.7	0.6	2.9	0.1	0.1	0.1	0.1	22.5	2.7	0.0
	Para	9.7	0.5	9.3	13.3	10.7	12.4	19.4	16.6	0.1	9.7	17.5
Turn		11.8	11.8	11.9	10.9	8.3	9.8	6.6	7.8	11.6	10.2	3.2
Others		32.6	42.1	49.0	45.0	53.9	57.2	50.7	53.5	16.8	52.2	43.8

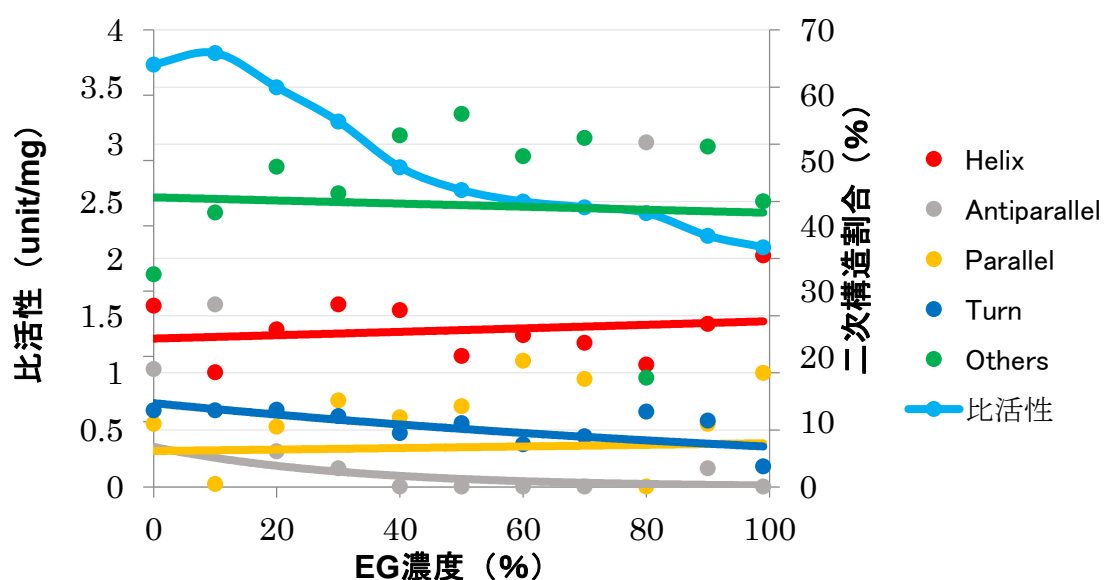


Fig. 2-8 Activity and secondary structure ratio of p2-NylC

Table 2-3 Ratio of secondary structure of GYAQ

EG Concentration (%)		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99
Helix	Helix 1	17.2	9.1	11.3	16.5	4.1	14.1	8.0	0.0	13.5	22.8	20.9
	Helix 2	11.5	8.1	9.8	6.5	7.6	16.4	23.1	12.5	20.2	14.3	21.7
Sheet	Anti 1	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	6.1
	Anti 2	0.0	6.5	0.0	10.9	5.3	0.0	0.0	3.8	0.3	0.0	0.0
	Anti 3	16.6	10.3	9.1	13.5	9.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Para	10.4	5.5	15.2	5.5	16.3	16.2	15.1	14.6	16.1	16.0	17.1
Turn		11.6	9.6	9.2	8.9	12.2	8.8	7.6	5.7	8.1	9.2	6.2
Others		32.6	50.9	45.6	37.6	45.3	44.6	46.1	63.4	41.7	37.1	28.0

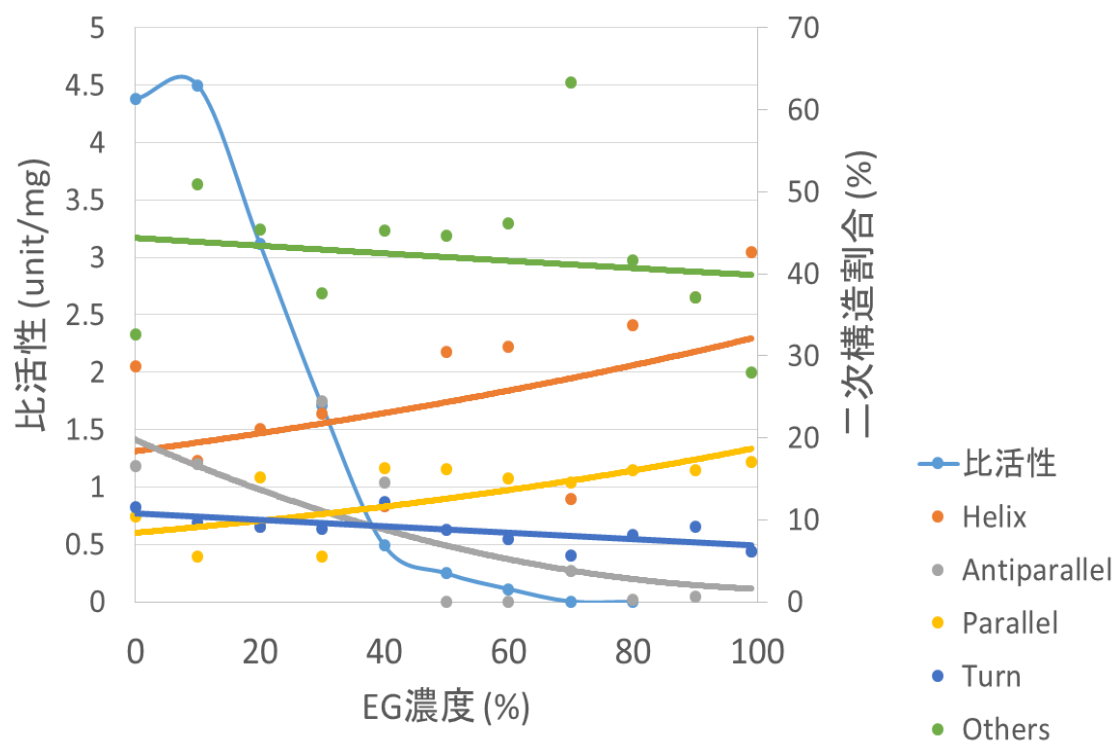


Fig. 2-9 Activity and secondary structure ratio of GYAQ

## 2.5 結論

G<sup>122</sup>Y<sup>130</sup>A<sup>36</sup>Q<sup>263</sup> 変異が導入された NylC 変異体(GYAQ)では、10% EG 中で最も高い活性を示し、EG 濃度をさらに上昇させると、比活性の低下がみられた。一方で、親型酵素である p2-NylC では EG 濃度を上昇させても GYAQ と比較して比活性の減少率は穏やかであった。EG 中における CD スペクトルデータを用いて二次構造の割合を予測したところ、GYAQ では p2-NylC と比較して顕著な Helix 構造の増加が確認された。このことより、比活性は EG による二次構造に依存して変化しており、特に Helix 構造の増加により比活性が低下することが示唆された。

また、また、50%EG を含む溶液中で、GYAQ を 95°C まで加熱した後、25°C に戻した状態で CD 測定を行ったところ、加熱を行わなかった場合に近いスペクトルが得られたことから、GYAQ は EG 中で構造がリフォールディングする可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 永井圭介：立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の機能開発と応用：博士論文 (2014).
- 2) 大島祥平：ナイロン加水分解酵素(NylC)の自己分断機構の解明：修士論文 (2013).
- 3) 田中優佑：ナイロンオリゴマー分解酵素(NylC)の高度耐熱化とナイロン分解への応用 (2012).
- 4) Negoro, S., N. Shibata, Y. Tanaka, K. Yasuhira, Y. H. Shibata, H. Hashimoto, and Y. Lee. The three-dimensional structure of nylon hydrolase and the mechanism of nylon-6 hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 287: 5079-5090 (2012).
- 5) 三田隆二、田中優佑：p2-NylC における 122 番目のアミノ酸残基の部位特異的ランダム変異法による耐熱化：中間報告 (2010).
- 6) Petrie KL, Joyce GF. Deep sequencing analysis of mutations resulting from the incorporation of dNTP analogs. *N. acid. Res.* 22 8095-8104 (2012).
- 7) 安平健吾：好アルカリ性細菌の生産するナイロンオリゴマー分解酵素の立体構造解析及びアミド合成への応用：博士論文 (2007).
- 8) 橋本悠,：ナイロンオリゴマー分解酵素(EIII)の触媒機能と熱安定性について：卒業論文 (2009).
- 9) Micsonai et al, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2015) vol. 112 no. 24 E3095-E3103. Doi/10.1073/pnas.1500851112

## 第3編

### *Arthrobacter* sp. KI72 の

### ゲノム解析と 6-アミノヘキサ酸代謝系の同定

## 第3章

### *Arthrobacter* sp. KI72 のゲノム解析

#### 3.1 諸言

近年、巨大ゲノムの塩基配列決定法の開発が進み、分子生物学の分野ではゲノム全体の研究がおこなわれるようになった。ゲノム解析とは、生物のゲノムのもつ遺伝情報を総合的に解析することである。ゲノム研究は 1)ゲノミクス 2)ポストゲノミクス 3) バイオインフォマティクス 3つの異なるタイプの分析に分類できる。ゲノミクスとは、DNA 分子の塩基配列を決定することであり、ゲノム解析の基本である。ゲノミクスの次に行われるポストゲノミクスとは、機能的ゲノミクスとも呼ばれ、得られたゲノム塩基配列を用いて遺伝子や制御配列などの位置を決定し、続いて発見された未知遺伝子の機能の同定が行われる。また、バイオインフォマティクスとはゲノミクスあるいはポストゲノミクス分野の研究でコンピュータシステムを使用することをいい、莫大な情報を取り扱うゲノム解析において、必須の分析方法である。このようにして生物のゲノムからは、多大な情報を得ることができ、特に未知遺伝子の解析を進める場合には有用なツールとなる。

*Arthrobacter* sp. KI72 ははナイロンオリゴマーを単一の窒素/炭素源として生育するユニークなバクテリアで、この生物のゲノムを解析することで、生分解が難しいと考えられているナイロンの酵素分解において新たな知見を得られる可能性がある。また、KI72 株のナイロンモノマー(Ahx)以降の代謝経路は不明であり、ゲノム情報はその代謝経路解明に大きく寄与すると考えられる。

本章では、KI72 株のナイロンオリゴマー代謝にかかわる遺伝子を分析するため、ゲノム解析を行った。

## 3.2 実験材料

### 3.2.1 使用菌株

本研究で使用した菌株を Table 3-1 に示した。

Table 3-1 Bacterial strain and plasmids used in this study.

Strain	Characteristic(s)
<i>Arthrobacter</i> sp. KI72	Acd <sup>+</sup> , Ald <sup>+</sup> , Ahx <sup>+</sup> , Nom <sup>+</sup> (pOAD1, pOAD2, pOAD3)

Acd, Ahx cyclic dimer; Ald, Ahx dimer; Nom, Ahx oligomer.

### 3.2.2 使用機器

第 1 章に準じた。

### 3.2.3 使用培地

第 1 章に準じた。

## 3.3 実験方法

### 3.3.1 *Arthrobacter* sp. KI72 のゲノム抽出

5 ml の LB 培地に一白金耳の *Arthrobacter* sp. KI72(グリセロールストックとして  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存)を植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で一晩振とう培養を行った。培養液 1 ml を 100 ml の LB 培地に植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$  で一晩振とう培養を行った。遠心分離( $4^{\circ}\text{C}$ , 8000 rpm, 5 min)によってサンプルチューブに集菌した。4 ml の 50 mM(あるいは 10 mM)リン酸緩衝液(pH 8.5)に懸濁後、再度遠心分離( $4^{\circ}\text{C}$ , 8000 rpm, 5 min)を行い、菌体を洗浄した。2 ml の 50 mM(あるいは 10 mM)リン酸緩衝液(pH 8.5)に懸濁後、4 mg の Lysozyme を添加し、激しく攪拌し、 $37^{\circ}\text{C}$  にて 2 時間放置した。2 ml の STE(TE バッファに終濃度 150mM となるように NaCl を溶解)を添加し、 $900\mu\text{l}$  ずつマイクロチューブに分注した。この溶液に  $60\mu\text{l}$  の 20% SDS 溶液を加え攪拌した。液体窒素と  $65^{\circ}\text{C}$  のウォーターバスを用意し、凍結/融解を繰り返し行い(液体が透明になるまで(25 回程度))、菌体を破壊した。その後、得られた液体を 1 本のサンプルチューブに回収し、フェノール溶液を等量添加した。転倒攪拌により混和した後、遠心分離( $20^{\circ}\text{C}$ , 5000 rpm, 20 min)を行い、上澄液を分取した。フェノール溶液およびクロロホルム溶液を各々上澄液の半量添加し、転倒攪拌により混和した。その後、遠心分離( $20^{\circ}\text{C}$ , 5000 rpm, 20 min)を行い、上澄液を分取した。上澄液を 100%エタノールを入れたピーカに滴下した。析出した Total DNA をマイクロピペットのチップを用いて巻き取り、マイクロチューブに移した。Total DNA を 1.5 ml の TE バッファに溶解し、エタノール沈殿により精製後、適宜 30~50 ml の TE バ



ッファに溶解し、ゲノムサンプルとした。

### 3.3.2 ドラフトゲノム解析およびドラフトアセンブル

3.3.1 で取得したゲノムサンプルを試料として、タカラバイオ株式会社にドラフトゲノム解析およびドラフトアセンブルを依頼した。

### 3.3.3 アノテーション

3.3.2 で得られたゲノム配列を Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) を使用してアノテーションした。

## 3.4 実験結果および考察

### 3.4.1 *Arthrobacter* sp. KI72 のゲノム抽出

電気泳動の結果、単一のバンドを確認することができた。



Fig. 3-1 Electrophoresis of strain KI72 genome.

Lane M: Marker ( $\lambda$ -EcoT14 I digest), Lane 1: Strain KI72 genome

### 3.4.2 ドラフトゲノム解析およびドラフトアセンブル

シーケンスおよびアセンブルの結果、下表のとおり結果が得られた。

Table 3-2 Result of sequence analysis

項目	Strain KI72 genome
解析総リード数	78,562,074
解析総塩基数(b)	3,928,103,700
アセンブルに使用されたリード数	78,422,480
総コンティグ数	105
総コンティグ塩基数(b)	4,568,574
GC 塩基数	2,899,722
GC 含量(%)	63.5
平均コンティグ長(b)	43,510
最大コンティグ長(b)	372,747
N50 コンティグ長(b)	143,009
500b 以上のコンティグ数	71
500b 以上のコンティグ総塩基数(b)	4,562,477
500b 以上のコンティグ平均長(b)	64,260
4kb 以上のコンティグ数	58
4kb 以上のコンティグ総塩基数(b)	4,541,327
4kb 以上のコンティグ平均長(b)	78,299

### 3.4.3 アノテーション

アノテーションの結果、KI72 株のゲノムには下表の遺伝子が存在することが確認された。

Table 3-3 Result of annotation

項目	Strain KI72 genome
Coding sequences (CDSs)	4,372
tRNA	54
rRNA	6

## 3.5 結論

完全なアセンブルはできなかったが、KI72 株ゲノムの 105 本のコンティグ配列を得ることができた。

## 参考文献

- 1) Conn HJ, Dimmic I. 1947. Soil Bacteria Similar in Morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. J Bacteriol 54:291-303.
- 2) Negoro S. 2000. Biodegradation of nylon oligomers. Appl Microbiol Biotechnol 54:461-466. <https://doi.org/10.1007/s002530000434>
- 3) Okada H, Negoro S, Kimura H, Nakamura S. 1983. Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers. Nature 306:203-206. <https://doi.org/10.1038/306203a0>
- 4) Kato K, Ohtsuki K, Koda Y, Maekawa T, Yomo T, Negoro S, Urabe I. 1995. A plasmid encoding enzymes for nylon oligomer degradation: nucleotide sequence and analysis of pOAD2. Microbiol 141:2585-2590. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2585>
- 5) Yasuhira K, Uedo Y, Takeo M, Kato D, Negoro S. 2007. Genetic organization of nylon-oligomer-degrading enzymes from an alkalophilic bacterium *Agromyces* sp. KY5R. J Biosci Bioeng 104:521-524. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.521>
- 6) Yasuhira K, Tanaka Y, Shibata H, Kawashima Y, Ohara A, Kato D, Takeo M, Negoro S. 2007. 6-Aminohexanoate oligomer hydrolases from the alkalophilic bacteria *Agromyces* sp. strain KY5R and *Kocuria* sp. strain KY2. Appl Environ Microbiol 73:7099-7102. <https://doi.org/10.1128/AEM.00777-07>
- 7) Yasuhira K, Shibata N, Mongami G, Uedo Y, Atsumi Y, Kawashima Y, Hibino A, Tanaka Y, Lee Y-H, Kato D, Takeo M, Higuchi Y, Negoro S. 2010. X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation. J Biol Chem 285:1239-1248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041285>
- 8) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Mizuno N, Wakitani Y, Tsurukame J, Matsumoto K, Kawamoto I, Takeo M, Higuchi Y. 2005. X-ray crystallographic analysis of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase: molecular basis for the birth of a nylon oligomer degrading enzyme. J Biol Chem 280:39644-39652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505946200>
- 9) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y. 2007. Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex: catalytic mechanism of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase. J Mol Biol 370:142-156. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.043>
- 10) Negoro S, Shibata N, Tanaka Y, Yasuhira K, Shibata H, Hashimoto H, Lee Y-H, Oshima S, Santa R, Oshima S, Mochiji K, Goto Y, Ikegami T, Nagai K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y.

2012. Three-dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis. *J Biol Chem* 287:5079-5090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.321992>
- 11) Nagai K, Iida K, Shimizu K, Kinugasa R, Izumi M, Kato D, Takeo M, Mochiji K, Negoro S. 2014. Enzymatic hydrolysis of nylons: quantification of the reaction rate of nylon hydrolase for thin-layered nylons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:8751-8761. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5885-2>
- 12) Hernandez D, François P, Farinelli L, Osterås M, Schrenzel J. 2008. *De novo* bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. *Genome Res* 18:802-809. <https://doi.org/10.1101/gr.072033.107>
- 13) Sugawara H, Ohyama A, Mori H, Kurokawa K. 2009. Microbial genome annotation pipeline (MiGAP) for diverse users, abstr S-001, p 1–2. Abstr. 20th Int. Conf. Genome Informatics, Kanagawa, Japan.

## 第4章

### *Arthrobacter* sp. KI72 の 6-アミノヘキサン酸代謝系の同定

#### 4.1 諸言

KI72 株はナイロンオリゴマーを単一の窒素/炭素源として生育するバクテリアで、pOAD2 上にコードされた NylA、NylB および NylC の 3 種の酵素がナイロンオリゴマーから Ahx への分解を担っていることが明らかとなっている。上記 3 種の酵素 NylABC が協働することにより、ナイロンオリゴマーはモノマーまで分解されることが明らかとなっているが、それ以降にモノマーである Ahx は KI72 株のどのような酵素によって、どのような物質に変換されるかは不明である。

4-アミノ酪酸( $\gamma$ -アミノ酪酸: GABA)は C4 のメチレン鎖の一方の末端にアミノ基、もう一方の末端にカルボキシル基を持つ Ahx と類似した構造の物質で、ほとんどの原核/真核生物においてグルタミン酸デカルボキシラーゼにより L-グルタミン酸の脱炭酸により得られる非タンパク性のアミノ酸である。GABA の分解は 4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.19)によるコハク酸セミアルデヒド(SSA)へのアミノ基転移反応により開始する。その後、SSA は NAD(P)<sup>+</sup>依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(EC 1.2.1.16)によりコハク酸へと酸化されるか、もしくはコハク酸セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.79)により  $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸へと還元される。本章では GABA との構造類似性を根拠に、不明である KI72 株のナイロンモノマー以降の代謝経路の解明を試みた。

#### 4.2 実験材料

##### 4.2.1 使用菌株、プラスミドおよび酵素

本研究で使用した菌株、プラスミドおよび酵素を Table 4-1 に示した。

Table 4-1 Bacterial strain and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Characteristic(s) <sup>a</sup>
Strains	
<i>Arthrobacter</i> sp. KI72	Acd <sup>+</sup> , Ald <sup>+</sup> , Ahx <sup>+</sup> , Nom <sup>+</sup> (pOAD1, pOAD2, pOAD3)
<i>Arthrobacter</i> sp. KI722	Acd <sup>-</sup> , Ald <sup>-</sup> , Ahx <sup>+</sup> (pOAD1, pOAD3)
<i>Arthrobacter</i> sp. KI723	Acd <sup>-</sup> , Ald <sup>-</sup> , Ahx <sup>++</sup> (pOAD11, pOAD3)
<i>Arthrobacter</i> sp. KI723T1	Acd <sup>+</sup> , Ald <sup>+</sup> , Ahx <sup>++</sup> (pOAD11, pOAD2, pOAD3)
<i>Arthrobacter</i> sp. KI724	Acd <sup>-</sup> , Ald <sup>-</sup> , Ahx <sup>-</sup> (pOAD12, pOAD3)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup></i> ), <i>e14<sup>-</sup></i> ( <i>mcrA<sup>-</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )/F <sup>c</sup> [ <i>traD36</i> , <i>proAB<sup>+</sup></i> , <i>lac I<sup>q</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]
<i>E. coli</i> BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i>
Plasmids	
pCold I	Amp <sup>r</sup>

<sup>a</sup> Acd, Ahx cyclic dimer; Ald, Ahx dimer; Nom, Ahx oligomer.

#### 4.3 使用機器

本実験に使用した機器を以下に示した。

高圧蒸気滅菌機：平山製作所製 HA-24 型

pH メーター： HORIBA 製 F-22 型

振盪培養器： TAITEC 製 BIO-SHAKER BR40LF 型

TAITEC 製 BIO-SHAKER UD-200 型

恒温器： 田葉井製作所製 電気恒温器 ET-2 型

SANYO 製 MIR-153 型

遠心分離機： トミー精工製 微量高速冷却遠心分離機

分光光度計： 日本分光製 V-730 bio

超音波破碎機： トミー精工製 UD-200 型

電子天秤： SARTORIUS 製 AUW220D 型

スラブ型電気泳動装置： ATTO 製 Compact PAGE-twin AE-7341 型

水平サブマリン型電気泳動装置： ADVANCE 製 Mupid-2 型 Mupid-ex (u)型

紫外線照射装置： ATTO 製 DT-20M 型

写真撮影装置： ATTO 製 N-50 型

PCR 装置： TaKaRa 製 TP600 D-5767 型

#### 4.4 使用培地

本実験で使用した培地を Table 4-2~6 に示した。それ以外の培地は第 1 章に記載したものに基づいた。

Table 4-2 Composition of 6-aminohexanoate (Ahx) minimal medium

6-aminohexanoate	4.37 g (0.2 M final conc.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	5.0 g
FeCl <sub>3</sub>	3 mg
Bacto yeast extract	0.5 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 4-3 Composition of 4-aminobutanoate (GABA) minimal medium

4-aminobutanoate	5.16 g (0.2 M final conc.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	5.0 g
FeCl <sub>3</sub>	3 mg
Bacto yeast extract	0.5 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 4-4 Composition of glucose minimal medium

Glucose	6.01 g (0.2 M final conc.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	5.0 g
FeCl <sub>3</sub>	3 mg
Bacto yeast extract	0.5 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 4-5 Composition of adipate minimal medium

Adipate	4.87 g (0.2 M final conc.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	5.0 g
FeCl <sub>3</sub>	3 mg
Bacto yeast extract	0.5 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

Table 4-6 Composition of succinate minimal medium

Succinate	5.90 g (0.2 M final conc.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	5.0 g
FeCl <sub>3</sub>	3 mg
Bacto yeast extract	0.5 g
Distilled water	Up to 1000 ml
pH 7.0	

## 4.5 実験方法

### 4.5.1 最少培地における *Arthrobacter* sp. KI72 とその変異体の増殖実験 1

5 ml の LB 培地に一白金耳の *Arthrobacter* sp. KI72 およびその変異体(グリセロールストックとして -80°C にて保存)を植菌し、30°C で OD<sub>600</sub>: 1 となるまで振とう培養を行った。培養液 1 ml を 100 ml の各種最少培地(Ahx, GABA, Glucose)に植菌し、振とう培養を行った。任意の時間に 3 ml の培養液をサンプリングし、OD<sub>600</sub> にて菌体濁度を測定した。

### 4.5.2 代謝経路の予測と候補遺伝子の探索

Ahx と構造が類似している GABA 代謝経路をもとに、Ahx の代謝経路を予測した。また、GABA 代謝にかかわる酵素 1)GABA アミノトランスフェラーゼ 2)アジピン酸およびコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を用いて、その配列と相同な配列を KI72 株ゲノム配列中で確認することにより、Ahx 代謝候補遺伝子を探索した。相同性確認に用いたクエリ配列は Table 4-7 のとおりである。また、候補として抽出した GABA アミノトランスフェラーゼを NylD、アジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを NylE と命名



した。

Table 4-7 Query sequences for searching the *nylD* and *nylE* candidate.

Gene ID	GenBank accession no.	Function	Source
<i>gabT</i>	WP_011775705	4-aminobutyrate aminotransferase	<i>Arthrobacter aureescens</i>
<i>ARUE_c21120</i>	WP_014921774	4-aminobutyrate aminotransferase	<i>Arthrobacter</i> sp. Rue61a
<i>G352_RS02865</i>	WP_003934671	6-oxohexanoate dehydrogenase	<i>Rhodococcus ruber</i> BKS 20-38
<i>MSMEG_3007</i>	YP_887325	Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155

#### 4.5.3 NylD および NylE の系統的解析

NylD および NylE 候補配列とその他関連配列を Clustal W プログラム (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>, Larkin et al. 2007.)を用いて、系統的解析を行った。

#### 4.5.4 NylD および NylE の遺伝子構造

3章で解析を行った KI72 株のゲノム情報を用いて、NylD および NylE の遺伝子構造を確認した。解析には in silico MolecularCloning(インシリコバイオロジー社)ソフトウェアを使用した。

#### 4.5.5 発現プラスミドの構築と精製

##### 4.5.5.1 発現プラスミドの構築

KI72 株のゲノム DNA を鋳型に、NylD<sub>I</sub> および NylE<sub>I</sub> 配列を PCR により増幅した。増幅後の NylD<sub>I</sub> および NylE<sub>I</sub> 挿入配列は制限酵素認識配列を持つようにプライマーを設計した。この反応に用いたプライマー、反応液組成および PCR プログラムは Table 4-8~10 に示した通りである。pCold I ベクターおよび NylD<sub>I</sub>/NylE<sub>I</sub> 挿入配列制限酵素的に切断した後、16°C で 1 晩ライゲーション反応を行った(Fig. 4-1)。ライゲーション産物は *E. coli* JM109 に形質転換させ、

LA 寒天プレートにコロニーを形成させた。得られた形質転換体よりプラスミド抽出を行い、再度 *E. coli* BL21 に形質転換を行った。

Table 4-8 Primers use in this study.

Primer name	5'→3' sequence (restriction enzyme) <sup>a</sup>	Purpose
NylD1-F	ATAC <b>ATATG</b> ACCGCAACTGCGAAC ( <i>NdeI</i> )	Amplification of
NylD1-R	ATAT <b>TCTAG</b> ATTATGCGTTGGCCTTGAC ( <i>XbaI</i> )	nylD <sub>1</sub>
NylE1-F	ATAC <b>ATATG</b> ATAGTCGTGGATCCGTGC ( <i>NdeI</i> )	Amplification of
NylE1-R	TAAGA <b>AATTCT</b> ATTTTCGTGGCCTCAGGG ( <i>EcoR1</i> )	nylE <sub>1</sub>

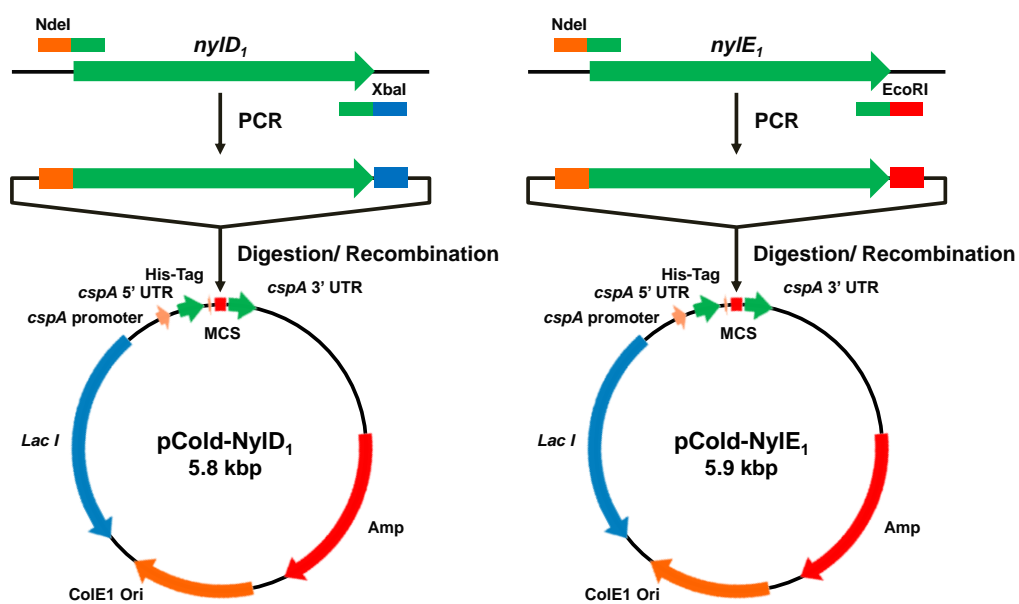
<sup>a</sup> Restriction sites are in bold, start codons are in bold italics and restriction enzymes recognizing indicated restriction sites are indicated in parentheses.

Table 4-9 Composition of PCR mixture

Forward primer (10 μM)	2.5 μl (0.5μM final conc.)
Reverse primer (10 μM)	2.5 μl (0.5μM final conc.)
Strain KI72 genome DNA (10μg/ml)	3.5 μl (35 ng)
PrimeSTAR Max DNA polymerase	25 μl
Distilled water	16.5 μl
Total	50 μl

Table 4-10 PCR program

Cycle no.	Denaturation	Annealing	Polymerization
0	2 min at 94°C	-	-
1	10 sec at 98°C	5 sec at 70°C	10 sec at 72°C
2	„	5 sec at 69°C	„
3	„	5 sec at 68°C	„
4	„	5 sec at 67°C	„
5	„	5 sec at 66°C	„
6	„	5 sec at 65°C	„
7	„	5 sec at 64°C	„
8	„	5 sec at 63°C	„
9	„	5 sec at 62°C	„
10	„	5 sec at 61°C	„
11	„	5 sec at 60°C	„
12	„	5 sec at 59°C	„
13	„	5 sec at 58°C	„
14	„	5 sec at 57°C	„
15	„	5 sec at 56°C	„
16-36	„	5 sec at 55°C	„
Last	-	-	7min at 72°C

Fig. 4-1 Construction of hybrid plasmid expressing NyID<sub>1</sub> and NyIE<sub>1</sub>

#### 4.5.5.2 酵素精製

3 ml の LA 培地に一白金耳の形質転換体コロニーを植菌し、37°Cで一晩振とう培養を行った。1 ml の培養液を 200 ml の LA 培地に植菌し、OD<sub>600</sub> が 0.4~0.5 となるまで振とう培養(37°C, 170 rpm)を行った。その後、速やかに培養フラスコを 10~15°Cに保温しておいたウォーターバスに浸し、1 時間放置した。終濃度が 1.0 mM となるよう IPTG を添加し、その後、あらかじめ 15°Cに設定しておいた振とう機に培養フラスコを設置し、振とう培養(15°C, 170 rpm, 24 hr)を行った。培養後、遠心分離(4°C, 8000 rpm, 10 min)によってサンプルチューブに集菌した。15 ml の 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁後、再度遠心分離(4°C, 4000 rpm, 10 min)を行い、菌体を洗浄した。10 ml の 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁後、超音波破碎 (20 kHz, 30 sec×4)を行い、遠心分離 (4°C, 15,000 rpm, 10 min)にて得られた上清を粗酵素液とした。酵素は TALON metal affinity resin(Takara bio)を使用し、取扱説明書に従い精製を行った。精製後、SDS-PAGE 分析を行い、目的タンパク質を確認した。目的タンパク質が含まれるフラクションは 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に対して一晩透析を行った。透析後、Amicon Ultra (MILLIPORE 製, 分画分子量 10kDa)を用いて遠心濃縮(4°C, 4,000×g, 30 min)し、酵素液とした。酵素濃度はウシ血清アルブミンを標準として、Bladford アッセイにより定量した。

#### 4.5.6 活性測定

##### 4.5.6.1 NylD<sub>1</sub> アッセイ

NylD<sub>1</sub> のアミノ基転移(Fig. 4-2)活性を定性的に確認するため、Table 4-11 のとおり反応液を調製し、30°Cで 16 時間反応させた。反応は 100°C, 5 min で停止させ、反応液の 1  $\mu$ l を分取し、薄層シリカゲルプレート(TLC silica gel 60, Merck Millipore)にスポットした。その後、展開溶媒(1-propanol : Ethyl acetate : Water : 25% ammonia solution = 4.49 : 0.75 : 4.49 : 0.28)にて展開し、0.2% ニンヒドリン溶液を用いて反応物を検出した。

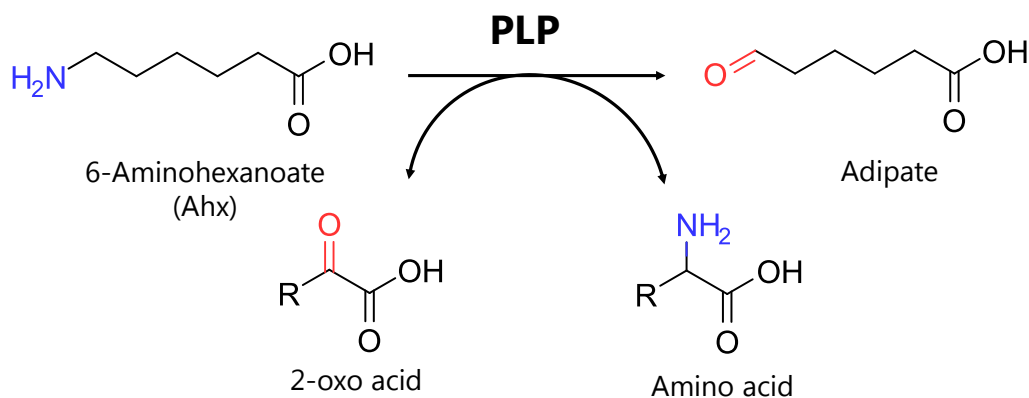


Fig. 4-2 Reaction with Ahx by aminotransferase

Table 4-11 Reaction mixture of NylD<sub>1</sub>

Composition	Final concentration
Amino donor (Ahx/GABA)	5 mM
Amino acceptor ( $\alpha$ -KG)	5 mM
Pyridoxal-5'-phosphate (PLP, 0.5 mM)	0.1 mM
NylD <sub>1</sub>	0.15 mg/ml
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 1 ml

KPB: Potassium phosphate buffer

##### 4.5.6.2 NylE<sub>1</sub> アッセイ(酸化反応)

NylE<sub>1</sub> の酸化(Fig. 4-3)活性を定量的に確認するため、Table 4-12 のとおり反応液を調製し、30°Cで反応させた。反応は NylE<sub>1</sub> の添加で開始し、反応の進行は NADPH の 340nm(A340)(  $\epsilon = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )吸収をモニターすることで確認した。比活性は NylE<sub>1</sub> の濃度を変化させ、異なる酵素濃度の初速度をプロットすることで得た。

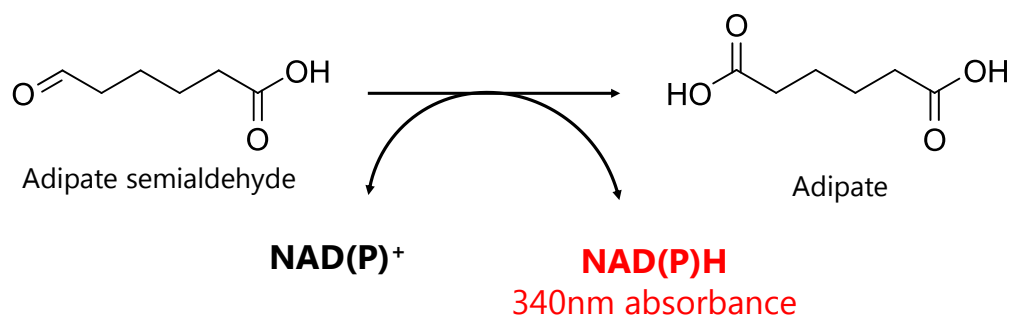


Fig. 4-3 Reaction with ASA by dehydrogenase

Table 4-12 Reaction mixture of NylE<sub>1</sub> (oxidative reaction)

Composition	Final concentration
Synthetic semialdehyde (ASA/SSA)	0.1 mM
NADP <sup>+</sup>	0.1 mM
NylE <sub>1</sub>	Quantum vis
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

#### 4.5.6.3 NylE<sub>1</sub> アッセイ (還元反応)

NylE<sub>1</sub> の還元活性を定量的に確認するため、Table 4-13 のとおり反応液を調製し、30°Cで反応させた。反応は NylE<sub>1</sub> の添加で開始し、反応の進行は NADPH の 340nm(A<sub>340</sub>)( $\epsilon = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )吸収をモニターすることで確認した。

Table 4-13 Reaction mixture of NylE<sub>1</sub> (reductive reaction)

Composition	Final concentration
Adipate	0.2 mM
NADPH	0.25 mM
NylE <sub>1</sub>	0.05 mg/ml
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

#### 4.5.6.4 NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系の構築

NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系(Fig. 4-4)に必要な成分を確認するため、Table 4-14 のとおり反応液を調製し、30°Cで反応させた。また、このすべての成分を添加したものをもとに、各成分を除外して反応が進行するかを確認した。反応の進行は NADPH の 340nm(A<sub>340</sub>)( $\epsilon = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )吸収をモニターすることで確認した。

また、構築した共役系による Ahx を出発物質としたアジピン酸への変換を確認するため、すべての成分を添加した系で反応曲線が変化しなくなるまで反応を行った。

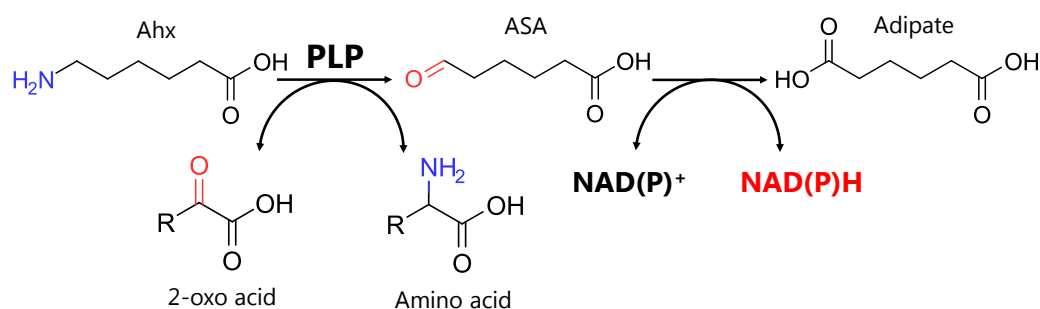


Fig. 4-4 Reaction of NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> coupled system

Table 4-14 Reaction mixture of NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> coupled system

Composition	Final concentration
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
EDTA	1 mM
PLP	0.1 mM
NylD <sub>1</sub>	0.05 mg/ml
NylE <sub>1</sub>	0.1 mg/ml
Ahx	0.2 mM
$\alpha$ -KG	0.25 mM
NADP <sup>+</sup>	0.25 mM
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

#### 4.5.6.5 共役系による NylD<sub>1</sub> のアッセイ

NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系により NylD<sub>1</sub> の活性を測定するため、第一に NylE<sub>1</sub> の濃度を変化させても、反応曲線が変化しない反応系(過剰量の NylE<sub>1</sub> が存在)を構築した(Assay 1, Table 4-15)。反応は 30°Cで行い、NylD<sub>1</sub> の濃度を変化させ異なる酵素濃度の初速度をプロットすることで比活性を得た。また、 $\alpha$ -KG に加えて 2 種類の 2 オキソ酸(ピルビン酸およびグリオキシル酸)をアミノ基受容体として、各々活性を測定した(NylD<sub>1</sub> のアミノ基受容体選択性評価)。

また、構築した測定系をもとに、反応系をスケールアップし、Table 4-16 のとおり反応液を調製し、30°Cで任意の時間反応させた(Assay 2)。反応液は 30 分ごとにサンプリングし、NADPH の 340nm(A340)( $\epsilon = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )吸収を確

認した。併せて、反応液の 1  $\mu$ l を分取し、薄層シリカゲルプレート (TLC silica gel 60, Merck Millipore) にスポットした。その後、展開溶媒 (1-propanol : Ethyl acetate : Water : 25% ammonia solution = 4.49 : 0.75 : 4.49 : 0.28) にて展開し、0.2% ニンヒドリン溶液を用いて反応物を検出した。

Table 4-15 Reaction mixture of NylD<sub>1</sub> assay system (Assay 1)

Composition	Final concentration
Amino donor (Ahx)	0.2 mM
Amino acceptor ( $\alpha$ -KG/Pyruvate/Glyoxylate)	0.25 mM
PLP	0.1 mM
NADP <sup>+</sup>	0.25 mM
NylD <sub>1</sub>	Quantum vis
NylE <sub>1</sub>	0.05 mg/ml (or 0.01 mg/ml for confirmation of excess quantity)
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

Table 4-16 Reaction mixture of NylD<sub>1</sub> assay system (Assay 2, scale-up system)

Composition	Final concentration
Amino donor (Ahx)	2 mM
Amino acceptor ( $\alpha$ -KG/Pyruvate/Glyoxylate)	2.5 mM
PLP	0.1 mM
NADP <sup>+</sup>	2.5 mM
NylD <sub>1</sub>	0.1 mg/ml
NylE <sub>1</sub>	0.1 mg/ml
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

#### 4.5.7 最少培地における *Arthrobacter* sp. KI72 とその変異体の増殖実験 2

5 ml の LB 培地に一白金耳の *Arthrobacter* sp. KI72 およびその変異体 (グリセロールストックとして -80°C にて保存) を植菌し、30°C で OD<sub>600</sub>: 1 となるまで振とう培養を行った。培養液 1 ml を 100 ml の各種最少培地 (Adipate/Succinate) に植菌し、振とう培養を行った。任意の時間に 3 ml の培養液をサンプリングし、OD<sub>600</sub> にて菌体濁度を測定した。

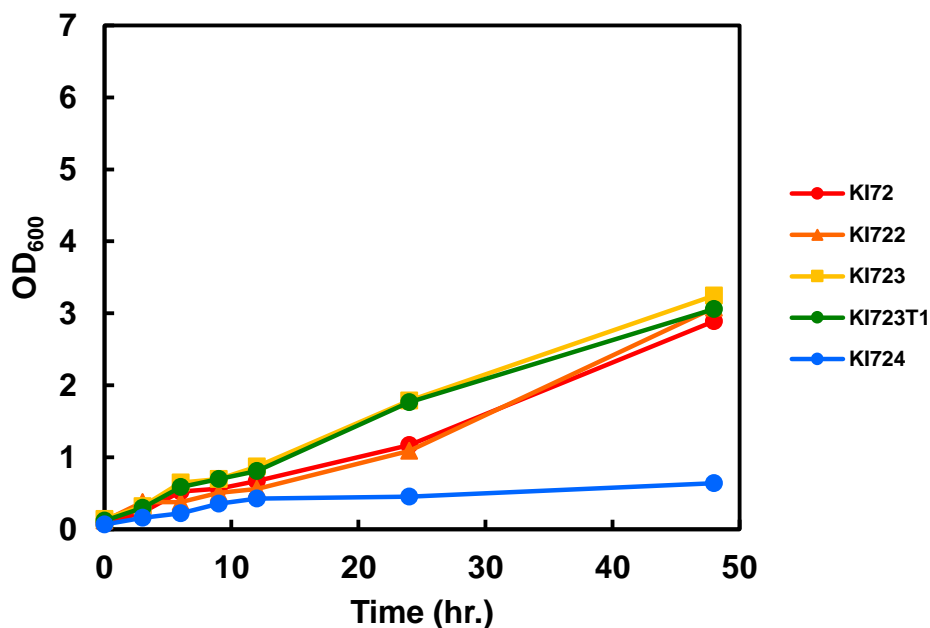


#### 4.6 実験結果および考察

##### 4.6.1 最少培地における *Arthrobacter* sp.KI72 とその変異体の増殖実験 1

*Arthrobacter* sp.KI72 とその変異株の Ahx, GABA および Glucose を唯一の炭素/窒素源とした資化能力を確認するため、各々最少培地を調製し、増殖を確認した。変異株間で見ると、GABA および Glucose 最少培地では増殖の程度はさほど変わらなかったのに対し(Fig. 4-5 B, C)、Ahx 最少培地では明瞭な差が確認された(Fig. 4-5 A)。GABA および Glucose 最少培地ではすべての変異株において良好な増殖が確認されたが、GABA 最少培地での増殖が顕著に高かった。Ahx 最少培地では、KI723/ KI723T1 の増殖が最も良好で、次いで KI72/ KI722 の良好な増殖が確認された。一方で、KI724 では増殖が低調であった。以上の結果より、KI72/ KI722/ KI723/ KI723T1 株は Ahx 代謝に必要な酵素遺伝子を保有していることが明らかとなった。また、各変異株はそれぞれが保有するプラスミド pOAD1 に大きな違いがある。それぞれ、KI72/ KI722 は pOAD1、KI723/ KI723T1 は pOAD11(pOAD1 がより大きいサイズに変異したプラスミド)、KI724 は pOAD11(pOAD1 がより大きいサイズに変異したプラスミド)を保有する。Ahx 最少培地で増殖に差がみられたのは、Ahx の代謝にかかわる酵素が pOAD1 上にコードされていることを示唆しており、KI724 が保有する pOAD12 では欠失や挿入により変異が起これ、Ahx 代謝が働かなくなっていると考えられる。また、KI724 は GABA 最少培地では良好な増殖を示したことから、pOAD12 の変異は GABA 代謝には無関係であることを示している。

**A**



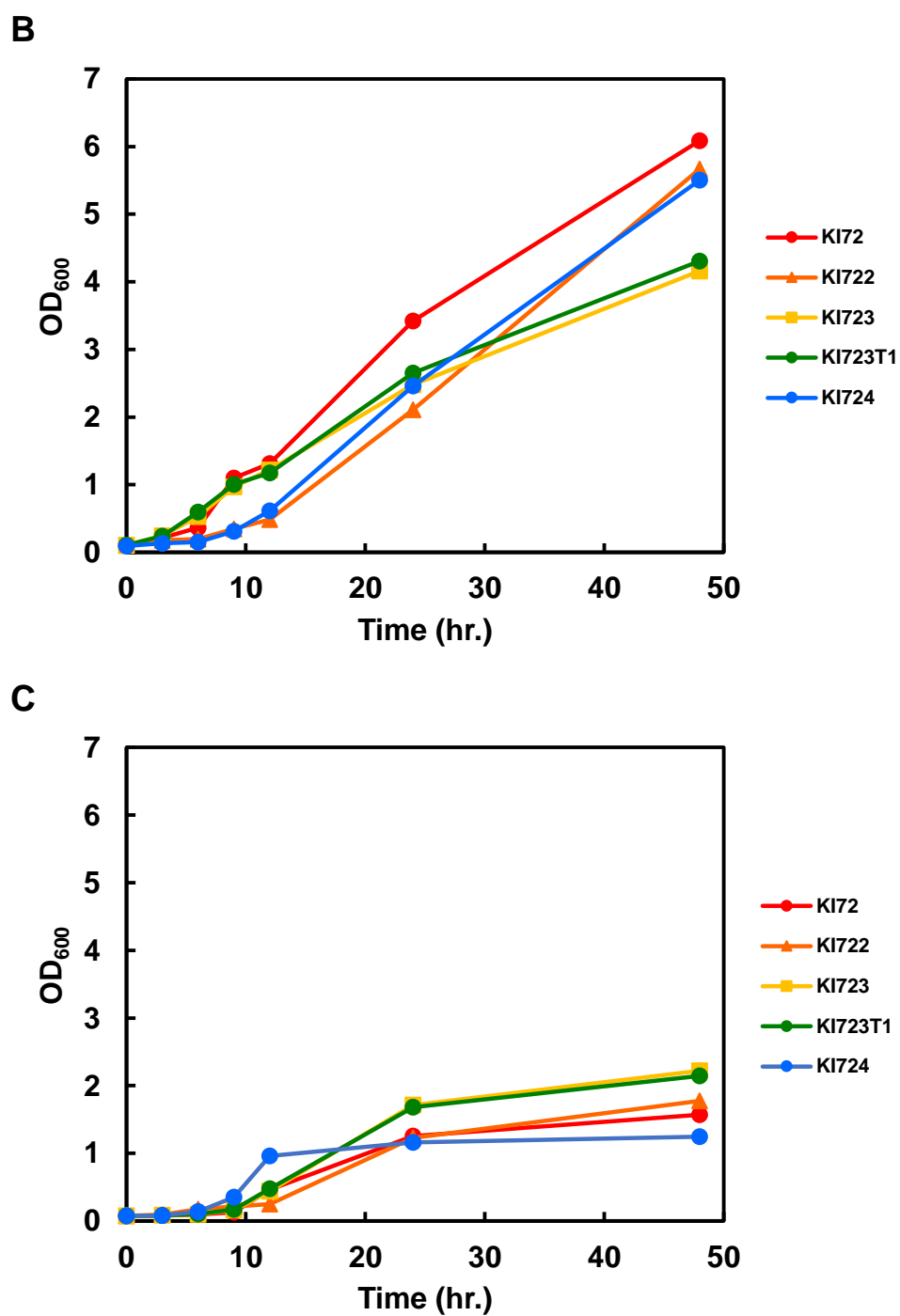


Fig. 4-5 Growth curve of strain KI72 and mutants.  
A Growth curve in Ahx, B GABA, C Glucose minimal medium.

## 4.6.2 代謝経路の予測と候補遺伝子の探索

### 4.6.2.1 代謝経路の予測

GABA 代謝経路では、GABA はアミノ基転移反応によりコハク酸セミアルデヒドに、次に酸化反応によりコハク酸に変換される。われわれは Ahx と GABA の構造類似性を根拠に、Ahx はアミノ基転移反応によりアジピン酸セミアルデヒドに、次に酸化反応によりアジピン酸に代謝変換されると予測した(Fig. 4-6)。また、GABA 代謝経路におけるアミノ基転移反応は GABA アミノトランスフェラーゼ(GABT)が、次の酸化反応はコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(SSALDH)が反応を触媒している。このことから、Ahx 代謝経路では GABT および SSALDH(もしくは既知のアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ: ASALDH)と類似した配列の酵素が上記の反応を触媒していると予測した。

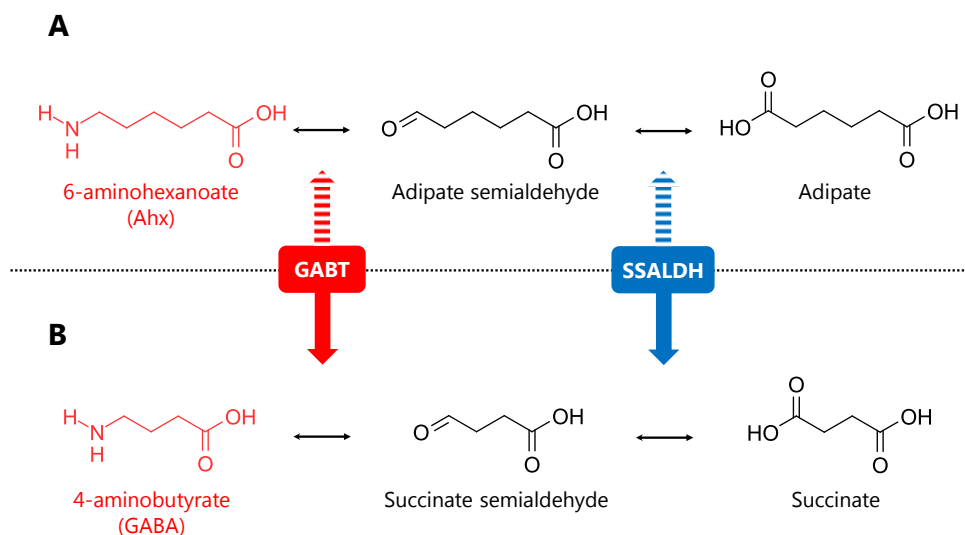


Fig. 4-6 Hypothetical Ahx metabolic pathway.

**A** Hypothetical Ahx metabolic pathway. **B** GABA metabolic pathway.

### 4.6.2.2 候補遺伝子の探索

GABA 代謝にかかわる酵素 1)GABA アミノトランスフェラーゼ 2)アジピン酸およびコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を用いて、その配列と相同な配列を KI72 株ゲノム配列中で確認することにより、Ahx 代謝候補遺伝子を探索したところ、nylD については 2 候補、nylE については 20 候補が抽出された(Table 4-17)。各候補配列の塩基配列を Fig. 4-7 に示す。

Table 4-17 Candidate gene of *nylD* and *nylE*.

Gene	Contig no.	Size of gene product (aa)	Related gene products	
			Function (source) <sup>a</sup>	% Identity
<i>nylD</i>				
<i>nylD</i> <sub>1</sub>	23	451	1)	95
<i>nylD</i> <sub>2</sub>	22	460	2)	37
<i>nylE</i>				
<i>nylE</i> <sub>1</sub>	1	487	3)	64
<i>nylE</i> <sub>2</sub>	15	493	4)	47
<i>nylE</i> <sub>3</sub>	4	451	3)	48
<i>nylE</i> <sub>4</sub>	6	506	4)	47
<i>nylE</i> <sub>5</sub>	39	479	4)	40
<i>nylE</i> <sub>6</sub>	49	458	3)	44
<i>nylE</i> <sub>7</sub>	4	519	3)	33
<i>nylE</i> <sub>8</sub>	22	523	4)	47
<i>nylE</i> <sub>9</sub>	4	513	4)	33
<i>nylE</i> <sub>10</sub>	23	507	4)	30
<i>nylE</i> <sub>11</sub>	5	498	4)	35
<i>nylE</i> <sub>12</sub>	5	465	4)	32
<i>nylE</i> <sub>13</sub>	23	479	3)	32
<i>nylE</i> <sub>14</sub>	26	499	4)	29
<i>nylE</i> <sub>15</sub>	62	430	3)	30
<i>nylE</i> <sub>16</sub>	2	491	3)	33
<i>nylE</i> <sub>17</sub>	7	483	4)	30
<i>nylE</i> <sub>18</sub>	25	508	4)	26
<i>nylE</i> <sub>19</sub>	7	707	4)	26
<i>nylE</i> <sub>20</sub>	5	1065	4)	28

<sup>a</sup>1) 4-aminobutyrate aminotransferase (*Arthrobacter aureescens*)2) 4-aminobutyrate aminotransferase (*Arthrobacter* sp. Rue61a)3) 6-oxohexanoate dehydrogenase (*Rhodococcus ruber* BKS 20-38)4) Succinate semialdehyde dehydrogenase (*Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155)

### 1) *nylD<sub>1</sub>*

```

1 atgaccgcaa ctgcgaacga actctcgtac cgcacgcgagc agaagcgcaa catcaacggc
61 acgttccccg gacccaagtc gcaggcactg gctgagcgcc gctccgccgt cgttgctgcc
121 ggtgtggctt cggcggttcc tgtctacgta gaagacgccg acggcgccat catccgcgac
181 gtcgacggca actctttcgt cgacctcggc tcgggcatcg ccgtcaccag cgtcggcgct
241 tccgatcccg ccgtcgtcgc cgtgtgccag gaagccgccg cgcacttcac gcacacctgt
301 ttcattggtga cgccgtacga aggctacgtc gccgtcgccg agcagctgaa ccgcctcacc
361 ccgggcaacc acgccaagcg caccgtgctc ttcaactccg gcgcggaagc cgtggagaac
421 gccatcaagg ttgccgcctt ggccaccggc cgcgacgccg tcgttgcttt cgaccacgcc
481 taccacggcc gcaccaacct gaccatggca ctgaccgcca agtccatgcc gtacaagacc
541 aacttcggac cgttcgcgcc cgaggtctac cgcattgcca tgagctaccc gttccgtgaa
601 gagaaccccg agatcacggg tgctgaggct gccaaagcgcg ccatcaccgc gatcgagaag
661 cagattggcg gcgaccaggt tgccgcaatc atcatcgaa ccatccaggg tgaggcgccg
721 attcgtctc cgccgaagg cttctgccc gcgtgtccg catgggcca ggaaaagggc
781 attgttttca tcgccgatga ggttcctgcc gcaccggtga atggttcgcc
841 gtcgaccacg agggggttgt tccggacatc atcaccatgg ccaagggcac cgcgggtggc
901 atgccgctgt ccgcgatcac cggccgcgct gacctgctcg acccggtcca cccggcggt
961 ctggcggtga cctacggtgg aaaccgggtt gcgtgtgcag cagcactggc agcaatcacc
1021 accatggagg agcacgatct caacggccgt gcccgccaca tcgaggaact cgccctgggc
1081 aagctccgcg aactggcctc cgaaacgtcc gtggtggggc acatccgtgg ccgcgccgca
1141 atcgtggcca tcgagcttgt tcagcccgcc tccaaggaac cgaacgtga ctaaccaag
1201 gctggttccg ccgcttgcc ccaaggaagg gtcacatcc tgacctgccc tacctacggt
1261 aacgtcatcc gcctgtctcc gccgtggtg atcagcgatg acctgctgct ggacggcctg
1321 gaagtactcg cgaacgccgt caaggccaac gcataa

```

### 2) *nylD<sub>2</sub>*

```

1 gtggagtcca ctacacgagg aggaccaatg accgtcacac ctgacatcgc cccagcatc
61 actgaccccg cccaggtcaa agcatctgcc cgcgcgttgc tcaccgaact ccccgggccc
121 cgctcccgcg agctggaggc cgaacgccgg cggcacgtta cagacgttt cggcatcacc
181 cagcctgtct ttatcgatcg ggcgtccat gccctgctcg tcgacgttga cggcaaccac
241 atcatcgatt tcgctccgg cattgcagtc accagcgtcg gtgcgcgcaa ccgctggtt
301 gccaaacgtg ccgcgccgca gcttgagcgc ttacacata cgtgcttcat ggttaccgaa
361 tattcttctc tcgtggacgt gtgcccgtgg ctcaacgaaa acaccccgcc ggacttcgag
421 aagcgcaccg cactcttctc caccggcgcc gaggcagtgg aaaatgccat caaatcgcg
481 cgcgccgcga ccgcgcgtcc caacgttctg gtcttcgatg aggcatacca cggccgcacc
541 cagctcacga tggccatgac agccaaggaa aaccctacc gactcaact cggcccgttc
601 ccggatccg ttttctgctg cccaccgct cccgccaca actctccaa tggcccgcc
661 gaagcgttgg cacgaattga ggcgatcctt gccgagaacg gaccggaac cttcgcagcg
721 atggtcatcg agcccttca gggcgaaggc ggcttcattg tccacgcgcc cggtttctc
781 gcaggactgc gggaaatcgc gaccggcat ggaatcgtcc ttgtcatcga cgagatccag
841 gccggcatgg ggcgcacagg gaagctgttc gcatccgaac acgacggcat tgccggcgac
901 atcacactca cagccaaggc cctcgccgcc ggctgcccc tctccgcggc gacaggcccg
961 gccgaactga tgaacgccgt gcacacaggc ggctcgccg gaacttacg cggtaaccg
1021 gtcgcatcgc aggtcgctt ggccgtgttc gaactcctt aagaggggac gctgctgag
1081 aatgcaattc gtgtcgaagc cgcgcgtcgc ggacgcctgg aacctctctt ggccttgaa
1141 ggcgtctcca gtgtccgcgg ccgcgggggc atgatggcca tcgaattcaa cgacgaatct
1201 ggcccgcgcg gagaccttgc cgtcgcagcc gccaaagaa cgaacgcca cggcgctact
1261 acgctgacgt gcgggacaaa cggcaacgtt atccgcttgc ttccgcctct ggggatcgaa
1321 gctgacgtcc tcgacgaagg cctcgcagtg ctggaggcat cgatccgctc ggtgctttca
1381 tga

```

### 3) *nylE<sub>1</sub>*

```

1 gtgatagtcg tggatccgtg cgcactggtg cgcgcggagt tccgcgatca cacaccgaac
61 aatgaaggag cgtcgtcgca catgggtgtc tacacgacag tgaatcctgc aaccggcgag
121 cagctggccg agttccccga gatcaccaac aaggaggcac gggaggctct cgtcgcgcc
181 gcggaagcct atccgcagtg gcgggatcgc gggctgcaag agcgggtcgc cctggtaag
241 cgcacgcccg cgtccaccg cgaacagcgg gaagaactgg ctgcgctcat cacgctcgag
301 atgggcaagc ccacgttcca ggcgcgtggc gaggtcgatc tcgtcgcgaa catctacgac
361 tattatgcgg accgcgcga gcagttcttc gcggacgagg tgctcgacat ctcggcccc
421 ggcaccgcca tcgtgaagac cgaaccggtc ggctcctgg tcggtatcat gccgtggaac
481 tacccttatt accaggtggc acggttcgcg gcccgaacc tgatcctggg caacacgatc
541 ctgctcaagc acgcgcgcaa ttgccgcgag tccgcctcgc ctatcgagcg ggtgttccgc
601 gaggcggggc tgcccgatgg cgtctacgcy aacgtgttcg ccaacaacgy tcagatcgcc

```

```

661 gagatgatcg cccgatccgcg cgtgcagggc gtctctctca ccggttccga gggggcgggc
721 tcagcgggtcg gcgaggtcgc cgggcggcat atgaagaagt acgtgctgga gctcgggtgga
781 tccgacccgt tcatcgtgct cgacgcgccc gacctcgacg cggcagccgc cgcagccgcg
841 gtcgggtcgtc tcgccaacgg cgggcaggcc tgcaccgcgt ccaagcgctt catcgtcctg
901 gacgcgggtgt acgacgcgtt cctcgagaag ttcacgcgac agagccgcgc gtacgccaca
961 ggcgatccgt cgtcggacga gacgaagctc ggcccgcctc cctccaccgc cggccgccac
1021 gatctcgtcg agctgggtcga cgacgccatc gaccgcggcg cgaaagtcca cctgggcggg
1081 gagggccccc acgcaccggg cgcctactat ccggcgaccg tgctgtcagg cgtgacaaa
1141 gacatgcgcg cctacgcaga ggaactattc ggcccggccg cggtcgtgca ccgcgccgcg
1201 tccgaagagg aagcgggtcca gatcgccaac gactccccgt tcggtctagg cggcacggtc
1261 ttctcggggc acctggaacg ggcgcaacgg gtcgcgcgac ggatcgagac gggcatggtc
1321 tggatcaaca gcacgagcaa gacagccccg gatctcccgt tcggcggggg caaggcctcg
1381 ggcgtcggcc gcgagctcgc gcattacggc atcaacgagt ttgccaacaa gaagctcgtc
1441 cgcgtccctg agggccacgaa atag

```

#### 4) *nylE<sub>2</sub>*

```

1 atgactgtca cgggtgaacg cgaaagcgaa ctgctggctt ccgtccctac tggcctgctg
61 atcaacggtc agtggcgccc cgcgggatcc ggaaagacct ttgatgttga ggacctgcc
121 acgggcaagg tgctgctcag catctccgac gccgggtccg aagacggcgc cgtgccctg
181 gacgcagctg cggctgcccc ggccgactgg gcccgcacgg caccgcgcga acgcggcgaa
241 atcctgcgcc gggcggttca catggtgacc gagcgcgcgc aagacttcgc actgctgatg
301 accctcgaaa tgggcaagcc cctggccgaa gccgcgggtg aagtaacctc cggcgctgag
361 ttctcgtcgt ggttctccga agaagcagtc cgtgtctccg gccgctactc ggcagccccg
421 gacggcaaga accgcctcct ggtccagaag aagcccgtgg gtccctgcct gttgatcact
481 ccgtggaact tcccgtggc catggccacc cgcaagattg ccccgcggtg tgcgcgcgtg
541 tgcaccatgg tgctcaagcc cgccaacctc acccgctga cgagcctcct ctttgcacag
601 gtcattgcagg aagccggcct tcccgcgggt gtccctgaac tcattccagac ctccaccgca
661 ggtgccgtca cgggcccgt gatcaaggat gaccgcctcc gcaagatctc cttaccgggt
721 tccacccgtg tgggcccagg actcatcgtg gagggcgcg acaaggctct ggcacacctc
781 atggagctgg ccgccaacgc cccgttcgtc gtcttcgaag acgcgcacct ggacaaggcc
841 gtcgaaggcg ccattcgtgc caagatgcgc aacatgggcg aggcctgcac agcagccaac
901 cgcttcacg tccacgagtc cgtcgcgcgac gctttcgtg agaagttcgc agcgaagatc
961 ggttccctca ccaccgccc cggcaccgag ccgaatcca aggtcggccc gctgatcgac
1021 ggcaaagccc gcgacggcgt ccacgccttg gtcagcgagg cagtcgcagg cggcgccgag
1081 gcagtcaccg gtggtgccgc cgtcgacggt cccggctact tctaccagcc cacggtgctc
1141 aagaacgtg ccgagggtgc ccgcatcctc aaggaagaaa tcttcggtcc ggttgccccg
1201 atcatcacgt tctccaccga agacgcgca gtccgcttgg ccaacaacac cgagtacggc
1261 ctggttgctc acgtcttcac caaggacctc aaccgcggcc tgcgcgtcag cgagaagctc
1321 gagaccggca tgctcggcct gaacgcggga gtcattctca acgcgcgtgc gccgttcggc
1381 ggcgtcaagc agtccggcct gggccgcgaa ggcggcgag agggcatcga agagtacctc
1441 tacaccagat acgtagggtat cgcggatccg tacgccgact ag

```

#### 5) *nylE<sub>3</sub>*

```

1 atgagctcat ttgccgttat tgatccggct accggaacca ttcatgccga gtaccccgcg
61 gccaccgacg cagaggtcga ggcaggactc ggcgcagcac agaagacata ccagagtggtg
121 tcccggacca cgaccgtggc cgagcgcgct gtcttgacca agcgcctcgc ggacctgttt
181 gttgagcgca aggacaaact ggccgccatc atcaaccgtg agatgggcaa gccgttgacg
241 caggccgtgg gggaagccga gttttccggt tccatcgag ctgccttcgc cgagcacgcg
301 gaagaatggc tcgcgacga ggaactggag gtggcggatg gactgaggac cttcttcgcg
361 taccagggcc tcggcgtgat cctgggcata atgccgtgga actacccta ctaccaagtg
421 gcacggttcg cgatcccaa catcatcctt ggcaacacgg tgatcgctcg ccacgcgagc
481 cagtgcggcg agtcggcggt ggcggtggcg gaactcttcc gcgacgcagg ttttcccgag
541 ggtgcctacg tcaacctgtt cgccaccac cagcagattt ccaccatgat cgcggacgac
601 cgcgtacagg gtgtctcgtc gaccggttcg gagcaagtgg gtgcgatcgt ggcggagcag
661 gccggacgtg ccctgaagaa atgcgtcctg gagcttggcg gcgccgacgt gttcctggtg
721 ctcgataccg atgacgtgga ccttgacgtg aagaaggccg tgatgggccc catgggcaac
781 accggccaat cgtgcaacgg ttccaagagg atcgtggtgc tggataagta ctttgacgag
841 tctgcgggga agttcaagc tgccatcgcc ggcagtcct acgagaacgg cgatttcggc
901 ccgattgcct cagattcggc cacaagttc ctggcttccc aggtacaggg tgcgttgacg
961 cagggcgcgg aaatcctagt gggcaacaat gagccccaag gcaacgtctt cactccgacg
1021 gtgattacca acatcaccac gtccatggac gtttacagcg aggagctgtt tgggtccggc
1081 gccagttgt acaaggtcag cagcgacgag gaagcaatca agctcgcgaa ctctcgcgg
1141 tacggcctgg gttcgggtgt gatctgcaac gacgtcgagc gcgccgagcg cgtcggcaac

```

1201 cagctcgacg tcggcatggt cttcgctcggg gcctacgacc tcagcgggtgc ggacgtgcca  
 1261 ttcggcggcg tcaagaagtc cggtacgggc cgcaactgg gcaaggtggg catgttggag  
 1321 ttcgccaaca agaagctggt ccgcttcgcg aagtag

#### 6) *nylE<sub>4</sub>*

1 atgactgctt caaccgcttt gacgtcattc gcgctcgttg tggacgcaac ccgccagcac  
 61 gaatccgata tgctggcgctc tgtgccgacc ggcctgttga tcggggggcca gtggcgcgat  
 121 tcgtccgacg gcggcacggt cgatgtccat gaccccgcca ccggtgaggt acttgcgacc  
 181 ctgcctccg caacgagcga ggatgcggtg tctgcgctcg atgccgcaga cgccgccag  
 241 cctttctggg ccgcgacggc gccgcgtgtc aggtccgaga tcttcgcccg tgcctttgaa  
 301 ctcgtcaccg tgagggcgga cgagttcgcc ctcttgatga ccttgaaat gggcaaacc  
 361 ttggcagaag ccggggcgga ggtcacctac ggtgctgaat tctgcgctg gttcgcgag  
 421 gaggccgtcc gggactacg acggtacctg accacgcccg aaggcaagaa caagatcctg  
 481 gttcagcaga agccgggttg tccctgcctg ctgatcacgc cctggaactt ccccttgccg  
 541 atggccaccc gcaaagtggc gcctgcccgt gggccgggtt gcaccatggt cctcaaacc  
 601 gccaaagtc cgcctcgac ggctcagtag ttcgccaga ccatgctcga cgcgggctt  
 661 ccggcaggcg tctcaacgt cgttgcgctc tcttctgcct ccggcatctc cggccccctg  
 721 atgagggact cgcggctccg gaaggtttcc ttcacggggg cgacgccggt gggcaagcga  
 781 ctcttgccg acgcggcagg caatgtcctg cggacgtcca tggaaactgg cggaacgct  
 841 ccgttcacg tgttcgagga ccgcgacgtg gacaaagccg tcgaaggggc catggcccg  
 901 aaaatgcgga acatggggga ggctgcacg gccgccaaac ggttcctggt gcacgaagct  
 961 gttgccgcg aattcacgc caagttcgcc cgggccatgg ggtccctgag cgtaggccg  
 1021 ggaaccgcgc ccactaccca ggtcggggcg ctgatcgacg ccggcgcccg cgcgcacgtg  
 1081 cagccttggt tgactgccgc cgtcgacgcc ggagctaccg cctgaccgg cgggaccccc  
 1141 gcggacggcc ccggtactt ctaccgcccc accgtcctgg cgaacgttcc caaggttgca  
 1201 gcgatcctcc gccaggaaat cttcggcccc gttgccccgg tgacaacgtt cagcaccgag  
 1261 gaagaagcga tccgccaagc caactccacc gagtacggcc tcgctgccta cctctacgga  
 1321 cgcgacttca accggctgct gcgggtgggt gagcagatcg agttcggcat ggtcggtttc  
 1381 aacgcgggg tcatctccaa cgcggcagca ccatttggcg gggtaaaca gtcaggcctc  
 1441 ggccgcgaag gcggttcga agggatcgcc gaatacacca ccaccagta catcgggatt  
 1501 gccgaccct acgccaacta a

#### 7) *nylE<sub>5</sub>*

1 gtgaacctga aatcagcaca ccacctgatt aatgggacct ggcattcgtc cgactcgtec  
 61 aaggatgtgc tggatccagg caatggcagc acagtcgggg aggtcgcgtg gggcgatgcc  
 121 gcggacgcaa cacgggcccgc cgatgcggca gcggaggctt ttggcagctg gtcccggacc  
 181 accgtccgga ccggggcaga cctccttcag aatgcggccg cctgtttggc cgagcgacgc  
 241 aacgaactcg ccacacggtt ggctgtggag gccggcaagc ggtaaccgga agcccaaggc  
 301 gaagtggact tctccgtgga atacttcgcg tggttcgcg aggaagtacg ccgcagcacc  
 361 ggaacggtca gcccaccgga gctcaggggt cggcgctcatc tcagcacgcg caaaccaata  
 421 ggtgttgctt tgagcctgac ccggtggaac ttcgggtgtt ccatccaggc ccgaaagctg  
 481 gcggccatgc tcgcccggcg atgcaccgtc gtgggcccgt tctctgacaa ggcgcctctg  
 541 gccgccaccg ggtctcttga agtccttcat gacgccgggt tccctgcccg cgtcgtgaac  
 601 ctggtccacg gcccgctccg cgaacgacc gcagcgtgc tcaagcacc cgccgtgcgc  
 661 gctgtcagct tcaccggctc caccggggtt ggcggccaga tcatggcgct cgccgtggat  
 721 gcgattgtga ggccgctgct tgaactgggc ggtaacgccc cgttcattgt gttcaggat  
 781 gccgaccttg acgcggccgt ggaagggcg gttcttggca ggctccggaa caccggccaa  
 841 tctgcgtag ccgcaaaccg cttcctggtt caggacagca tcgcgagcga gttcgcccgg  
 901 aaactggcgg cgaaattcga tgcgttgacg atcgccacg gcgttcccga ggggtgactg  
 961 gcagtccccg atcttgacc cgtgatcgac gacgaccggg cgcgcgccgt tcagacgttg  
 1021 atagatgatg ccttgaccg cggcgccacc cgcgtcacc agcgcacca ggtccctgac  
 1081 caaggttctt tctggcacc caccctctc gtcgacgttc ctgccgacgc gcagttggtc  
 1141 accgacgagg tcttcggacc tgcagccggt gttgtcacct tcgctcgga ggaagagcc  
 1201 atcagcatgg caaacgccac tgaaatgggg cttgctgcct acgtgtggag caaggacgcc  
 1261 aggcggggct gggaaatacc tgagcagctg gaggcaggca tcgctcgagt caacgacccc  
 1321 cccccctcag tagccttcgc ccctatgggc ggtgccaaag agtcgggcct gggcagggaa  
 1381 gggctccagc tcggcctgga ggagtttgag gaggtccagt acgtggcggt gagggcctag

#### 8) *nylE<sub>6</sub>*

1 atggcaatcg cgaccatcga cccaccacg ggcatacccc tgaaaacctt cgacgccccat  
 61 acgcccgaag aggtagaaaa ccggtatgcc cggcggaag cagcattccg gtcactgcag  
 121 aacacctcct ttgaagaacg tgcgcgtggt atgcataagg ccgctgacat cctcgaaagc  
 181 gaagccgatg aagtggcccc tctcatcgcc accgaaatgg gcaaaacctt aacgacagca

```

241 aagtacgagg ccctgaaatc agccaccggc atgcgggcact tcgccgatca cgcccagcgc
301 taccttagcc cggaaccccc ggtcccggcg tccgaggtca acgcctccaa cctccacgta
361 caattcgacc cgttaggcgt cgttttggcc gttatgccct ggaattaccc cctttggcag
421 gccgtccgct tcgcccggcc cgcactaatg gcgggcaaca cagggctcct caagcacgcc
481 tcaaacgttc ctcaatgtgc gctgtacctg ggagacctct tcgcccggcg cggttttctt
541 gaaggcgctg ttcagacact gctgggtgaa ggcaaagacg ttattccctt cgtggatgac
601 gcaaggatca gggcggtcac cctgaccggc tcgctcgctg ccggttccgc cattgctgaa
661 gcagccggca ggaacatcaa aaggagtgtc ctggaactgg gaggcattga tgtctttatc
721 gtcattgccct cgcccgatat tgaaaaggcc gctgcccagg cagtaatcgc acgccttcaa
781 aactcggggc agtcctgcat cgcggccaag cgcttctacg ttcacgaaga tgtctacgac
841 cgctttgaac atctgttcgt tacaggatat gccgaaacag ttgccgggtg ccccttggac
901 gaaagcacca gctttggccc cctggccacg gagcgaggac gccaggacgt tcatgaactg
961 gttagggacg ccgcgaaaaa aggggcagca gttcagtgtg gaggagaaa accggaaggg
1021 gagggtggtg actaccggc actaccggc gactgtcctc acgggcgtaa cagagaacat gcgcattctc
1081 cggaagaatg gcttcggccc cgtggcctgc ctctacaaag tgtcatcact ccaggaagcc
1141 atcgctctca gcaacgactc tgattttggt ttgagctcaa gcgtgtggac caatgacgag
1201 accgaagcca ccgaagcagc tcgatcaatc gaggcggggg gcgtcttcat caacggtctg
1261 acggcgctcat tcccggcggt gcctttcggc ggctcaaag actccggcta cggacgtgag
1321 ctctccgcct atggaatccg ggagtctgta aacatcaaga cgtctggac cgctga

```

### 9) *nylE<sub>7</sub>*

```

1 atgagtacgg acagccttac agagaacccc tcccggctctg ctcggaaga aaccgggca
61 cccggcgcg cgggtcttcg caacggacct gatacgcggg acgagatctt tgttggcga
121 gtgtggaccc ggggtagtgg tgcgctgac gagtcggtga atcccgctac ggcagaagt
181 tttgccaccc tccacgcagc aacggcgggc gatgtggacg ccgcagtggc cgccggcctg
241 gaggcgtca aagcgtcggg gtgggcaagg aggtcccgc acgaacgcgc cgcagtcctt
301 caccgcatca gctccgcgat tgaagccaac gctgacagga tcgcgagct gcagacgctt
361 gatacgggca aaagcctcgt ggaacgaag gcattggcca tgagcgcggc ggcaaccttc
421 cgcttcacgg cagctgcctt ggagaccatg gaagatgcc tgacgccgc gcggggcaac
481 tacctcagca tgtccaccta tgagccgatg ggggtggtgg gggccatcac gccgtggaat
541 tcacccatag ccagtgcgc gcaaaagggtg gctccggcac tcgcggcagg aaacgcgcgc
601 gtggtgaagc cgcgggtgtg ggcccctgg gtctcgctgc tgcgtggccc cctttgtgag
661 caggcgggtc ttctgcccgt tttgctgtcg gtgctgccgg gccctggccg ggtagtggc
721 gacgcgctcg ccaaacatcc ggatgttggg aagatctcct tcacgggccc gacttccacg
781 gggcgtcaac ttgcccacat cgcagccgaa aaaatcatgc ccatcacgtt ggaactggga
841 cgaaaatcac ccacggttat ttcgcccgat gccagctgg accaggctgt ggcggagtgt
901 ctctacggca tcttctctc aagcggtcag agctgcctcg ccgggtcgcg tgtcttcatc
961 cagcgcgccg tgtacgacga cgtggtggaa aggtcgtga aaggggcaaa agcgttgcgg
1021 atcggaaccg gcacagaccc ggctacgcag gtcgggcccc tgggtggcctt cgcacaccgc
1081 gacaccgttg cgggcatggt cgaagcagcg aagtcggccg gtgcgcaggt tttgtgcgga
1141 ggcgtgttcc ccacggagtc ccggttgtag ggccggggcgt tctatgagcc caccatcctt
1201 gcgggtgtca gtaactcgga cgccatctgc cagcaggaaa tttttggtcc cgtggccgtc
1261 atcctgccgt tcgacgacga agcggacctc atcgcccagg cgaacgacag cgtctttggc
1321 ttggcctgtg gcatctggac tgccgactac cgcggggcct ggccggttggc gcggggccatt
1381 gccgcgggca ccgtgtggat caacacctat aagcaattca gcatttcgac ccccttcagc
1441 gggcttaagg aaagcgggtc ggtaccgaa aagggccgcg acggcattcg ttctacatg
1501 cgccagaaga gcatctatat ggacctctcg ggtgcacca tccatgggc cggccttaa

```

### 10) *nylE<sub>8</sub>*

```

1 atggtgatag ccgtcaattt ccacggcggt tgtcaccatc ctacgcttct taaggaaaat
61 ctaatgacta ctgcccttgt aggtcacccc gccatctcac cactgcgtga agcgacctc
121 ctttctccg tcccaccgg attgctgac gggagccatt ggcggggagc gtccgacggc
181 ggcacgttca acgtgcacga tcccggcacc ggggaggtac tcgccactct cgctccgcc
241 accagcgagg acgcgatcgc cgcctctgac gcggccgacg ctgccaggc ctctggggc
301 cgcaccgcgc cgcgggtgcg cgcgagatc ctgcgccgcg ccttcgacct ggtcaccgag
361 cgcgcgagg acttcgccct gctgatgacc ctggaatggt gcaaaccctt ggccgaagcc
421 cgcggcgagg tcacgtacgg ggcggagttt ctgcgtggt tctctgagga aaccgtccgc
481 cctacggcc gctacctcac caccaccgaa ggcaaaagca agatcctcgt ccagacaaa
541 cccgtcgggc cctgcctgct catcaccccg tggaaacttc cctcgccat ggccaccgc
601 aaggtcgcgc ccgcgctgc cgcgggtgc accatggtcc tcaaaccgc caaactcacc
661 ccttgacgg cccagtactt cgcacgacc atgctcgacg ccggcctgcc cgcggcgctc
721 ctcaacgtcg tcgctcctc gtccgcctcc gggatctccg ggccgctgct cgcgacccg
781 cggctgcgga aggtctcctt cacgggctcc accccgctcg gcaagcggt catggccgac

```



841	gccgcccga	acgtgctgcg	gacctcgatg	gagctcggcg	gcaacgcccc	gttcacgtg
901	ttcgaggacg	ccgacctcga	cgccgccgtc	gaaggggcca	tggccgcca	gatgcggaac
961	atgggtgaag	cctgcaccgc	cgccaatcgg	ttcctgggtcc	acgaaaccgt	ggccgcagag
1021	ttcaccgcaa	agttcgccgc	cgccatgggc	gccctcacca	ccggccgagg	caccgaaccc
1081	ggcagcaacg	tcggtccgct	gatcgacctg	ggtgcccggg	atgatgtcca	tgccctggtc
1141	agtgcgcg	tcgacgccgg	agcagtggcc	gtgaccggcg	gcgccccggt	ggagggcccc
1201	gggtacttct	accagccaac	cgctctcgcc	gacgtgccga	atgacgccgc	gatcctgggc
1261	caggagatct	tcggtcccgt	cgccccggtc	accaccttca	ccaccgaaga	ggacgcgatc
1321	aaactggcga	acgccagcga	gtacgggctg	gcctcctacc	tctacagccg	agacttcaac
1381	cgtctcctgc	gcgtggccga	gcagattgag	ttcggcatgg	tcggcttcaa	cgccggcgtc
1441	atctcgaacg	ccgcagcgcc	cttcggcggt	gtcaagcagt	caggcctcgg	ccgcgaaggc
1501	ggctccgaag	gcacgcgcga	atacaccacc	acccagtaca	tcggcatcgc	caatcccttt
1561	accgtcagtt	ga				

# 11) *nylE<sub>9</sub>*

1	atgacgacct	ccaccgaaac	caccaaacac	tacgttcccg	aggacctgcc	cacccatatac
61	cagcactaca	tcaacggcga	gttcgttgac	tccgtctccg	ggaagacctt	cgacgtgctg
121	gacccgggtgt	ccaaccagaa	ctacgccacc	gccgccgcgg	gccagaagga	agacatcgac
181	cgcgccgtcg	ccgcagcgcg	cgaagcggtc	gtcaacggtc	cctggccgaa	gatgaagccc
241	cgcgagcgtg	cccgggtgct	gaacaagatc	gccgacgccg	tcgaggcgca	ggaagcccgc
301	ctcgccgagc	tcgagacgtt	cgataccggc	ctgccgatca	cccaggccaa	gggccaggca
361	ctccggggcg	cggagaactt	ccgcttcttc	gcggacctga	tcgtggccca	gttcgacgac
421	gcgatgaag	tcccgggtc	gcagatcaac	tacgtcaacc	gcaagccgat	cggcgctcgcc
481	ggcctgatca	cgccgtggaa	caccccggtt	atgctcgagt	cgtggaagct	cgtccgggcc
541	ttggccaccg	gcaacaccgt	ggtcctgaag	ccagcagagt	tcacgccgct	ctcggcgctcc
601	ttgtggggcg	agattttcaa	ggacgccggc	ctgcccgatg	gcgtgttcaa	cctgggtcaac
661	ggcctgggtg	aggaagccgg	tgatgcgttg	gtgaagcacc	cggatgttcc	gctgatctcc
721	tttaccggcg	agaccaccac	cggccagacg	atcttccgca	acgctgcaga	gaacctcaag
781	ggcctgtcca	tggaaactcg	cggcaagtcc	cgtgcgtcg	tggttcgcga	acgcctctg
841	gacgcgcgca	tcgattcggc	cctgttcggc	gtgttctcgc	tcaacggcga	acgctgcacc
901	gccggctccc	gcattcttgt	ggaacgcgcc	atctacgacg	aattctgtga	aaagtacgcc
961	gcccggggcca	agaacatcgt	ggtaggcgat	ccccacgatc	ccaagacca	ggtcggggca
1021	ctggtccacc	ccgagcacta	ccggaagggt	gcacgtacg	tggagatcgg	caagtccgaa
1081	ggccgggtcc	tggttgggcg	cgcccgaccc	gagaacttgc	ccgcaggggt	caacaacagc
1141	aactacatcg	cacccaccgt	gtttgcccag	gtcgcacctg	acgcgcggat	cttcaggag
1201	gaaatcttcg	gtcccgtcgt	ggccatcacc	ccgttcgaga	acgacgacga	agccctcgcc
1261	ctggcgaaaca	acaccaagta	cggcctggcc	gcctacatct	ggaccagaa	cctgacccgg
1321	gcgcacaact	tctcccaaaa	cgtcgaggcc	ggcatggtgt	ggctcaacag	ccacaacgtc
1381	cgcgacctgc	gcaccccggt	cggcgccgct	aaagcctccg	gcctggggcca	cgagggcggc
1441	taccgctcga	tcgacttcta	caccgaccag	caagccgtgc	acatcacctt	cggctccgtc
1501	cacaccccca	aattcggcga	cacgcccagg	tccggcgccct	ag	

# 12) *nylE<sub>10</sub>*

1	atgactgttt	acgcacagcc	aggtgccgaa	ggttcgaagg	ttaccttcaa	ggaccggtac
61	gagaactgga	ttggcgggga	atgggttgcc	ccggtcaagg	gtggctactt	cgagaacatc
121	actccggtga	cgggcaaggc	tttctgcgag	gttgcgcggg	gtacggccga	ggacatcgag
181	ctggcattgg	atgccgcaca	taaggcgggc	ccgtcctggg	gcaagacctc	agctgccgaa
241	cgcgcagcca	tcctgaacaa	gatcgcgga	cgcattgacg	agaacgtcga	gcttctggcc
301	gtcgtgaaa	cctgggataa	cggcaagccc	atccgcgaaa	ccctcaacgc	ggacattccc
361	ttggctgccg	accacttccg	ctacttcgcc	tccgccatcc	gcgcccagga	aggccacctg
421	tcccagctcg	atgacgacac	caccgcctac	cacttcaagg	agccgctggg	tgtcgtggga
481	cagatcatcc	cctggaactt	ccccatcctc	atggccgtgt	ggaagctcgc	tcccgcgtg
541	gctgccggca	acgccgtggt	gctcaagccc	gccgagcaga	cgccgagttc	catcctggtc
601	ctgatcgaac	tcacgttgga	cctgctgccc	gcgggtgtgg	tgaatgtggt	caacggcttc
661	ggcgtggagg	cgggcaagcc	gctcgttccc	agctccagga	tccggaagat	cgcgtttacc
721	ggcgagacca	ctacgggccc	gttgatcagc	cagtacgcct	ccaacaacct	catccccgtc
781	acgctggaac	ttggcggcaa	gagcccgaac	atcttcttcg	acgacgtcgc	cgcccagaac
841	gacgttttct	atgacaaaag	acaggaaagg	ttcacgctct	tcgctttcaa	acagggcgag
901	gtatgcacct	gcccctcccg	cggcctgggt	caggaggcca	tctacgacac	cttcctggcc
961	gacgtcatcg	ccgcacccaa	caagatcatc	cagggcaacc	cgttgacac	cgacacgcag
1021	gtcggcgcg	aggcttccaa	cgaccagttg	gagaagattc	tctcctacat	cgacattgga
1081	aagcaggaag	gagccaaggt	cctcaccggg	ggcgcccggg	ccgaactgtc	cggggacctg
1141	gccggcggt	actacgtcca	gcccaccatc	ttcgaaggcc	acaaccggat	gcggatcttc

```

1201 caggaggaga ttttcggtcc cgtggtgtcc gtgaccaagt tcagcgacta caacgatgcg
1261 atcggcattg ccaacgacac cctctacggc ctcggtgccc ggggtgtggc gcgcaacggc
1321 aacgtcgcct accgggcccg gcgggaaatc caggccggac gtgtgtgggt gaacaactac
1381 catgcctacc cggccggcgc ggccttcggc ggggtacaagt catccggcat cggccgtgag
1441 aaccatgcca tgatgctcga ccactaccag caaaccaaga acctgctggt cagctacaac
1501 gagaacaagc tcggcttctt ctag

```

### 13) *nylE<sub>11</sub>*

```

1 atgtcaacaa cagcatccac gctcttcac aacggttcat gggaggcagc tgcttccggt
61 gccgcccggg agatccgaaa cccggctgac ggtgaagtgt tcgccaccgt ttccgaaggt
121 ggcaagggaag acgccgaacg cgcgatcgcc gcagcccggg cggccttcga ctccggcggtt
181 tgggtcttcca ccccgcccc cgagcgcggc tcttctctgc tcaaagtcgc agccggactg
241 cgcgaacacc gcgaaaaatt cgcacggggc gaatccttgg acaccgaaa acgcatcatc
301 gagagccgca tcgacatcga tgacatcgct gctgtcttcg aatacttcgg caagctcgcg
361 ggccagcagc cgggcccgggt ggtggacgcc ggaaatccc acgtcgtcag caggatcgtg
421 tatgaaccgg tgggcgtctg cggcctcatt acgccgtgga actaccctt cctccaggcc
481 gcttggaaga ttgccccggc actggcagca ggctgcacct ttgtcctcaa gccagccgaa
541 ctgacgcctt ccaccgccat cctcgccatg cagctcatga aggacctggg cctgcccagc
601 ggcgtcgcga accttgtcac cggccccggc cgcaagggtg gcgcaccgct aacggaacac
661 cccgacgtcg acctcgtctc cttaccggc ggactggaga cgggcaagag catcgccgct
721 gccgtgcgcg caaccgtcaa gaagggtggc ctggagctgg gtggcaagaa ccccaacgtg
781 gtcttcgcgc acgcggactt cgacgcgcgc gtcgacaatg cgctgaacgg cgccttcctg
841 cactccgggg aggtttgctc agcagggtga cggctggtgg tagaggaatc catcgccgaa
901 cgcttcgtcg acgaactggt ccgcgcgcga gaagccatcc gtttgggtgg gcctttcgac
961 gaggacgcgg aaaccggccc gctgatctct gccgaccacc gcgacaaggt cctcgagtac
1021 gtccaacgcg gcatcgccga aggtgcccgg ctgcccggac gcggttcggc acctgaaggt
1081 gaaaagtacg acgcgggttt ctactaccgg ccgaccatcc tggaccgcgt caccggggga
1141 atgtcgggtg tgaccgatga ggcattcggc ccggtagtga ccgtggaac tttccgcacc
1201 gaagacgaag ccgtggcaac cgccaacgac acgatctacg ggtggccgg agcagtgtg
1261 acgcaggacg ccgggaaggc gcaacgggtg gcgggcaggc tccggcacgg caccatctgg
1321 atcaacgact accacccta cctccgcgag gcggagtggg gcggcttcgg acagtcgggc
1381 gtgggcccgg agctgggccc caccggactg gccgagtacc aggaagccaa gcacatctac
1441 cagaacacca ggccgcaggt aaccggctgg ttcgctgacc acagcaagga gaactag

```

### 14) *nylE<sub>12</sub>*

```

1 gtgatccagc ttcagaacat catcaacgga gaatccgtac gcgccggaca gacgttgccg
61 ttcttcgacc ccactaccgg tgaacagatc ggcaccgccc cggacagcga cgcggcggtg
121 gtggactccg cctttcaggc tgctgcccgc gccttcaaga gctacaagcg cagcagccg
181 ggaacccgcc agtcgctgct gttgcagctt gccgacctca tcgaggccaa cgtcgaccgg
241 ctgctggaag ccgaggttgc ctgcaccggc aaaccggccg cgtgaccaaa ggagctcgaa
301 atcctgcgcg gcgcagacca gctgcgcttt ttccgcccgt cttgccgcgt ggtttcagga
361 actgcccaga ccgagtacgt ggaagggttc tctctacca tccgcaggga gccgctgggc
421 gtcgtcgccc agatcacgcc gtggaactac ccgttcatga tggccatctg gaagatcggc
481 cccgccttgg cagcgggcaa cacactggtc ctcaagccag ccgacaccac cccgtggtcc
541 accgtgattc tcgctgaact ggcccaacag gtgtaccocg ccggtgtagt gaacgtggtc
601 tgccggcgga gcgaagccgg gcgacgcgat gtggaccacg aaatcccgga aatggtctcg
661 atcaccgggt ccaccggggc cggcgcccag gttatgtcgg cggcgctcga aacctcaag
721 gacgttcacc tggagctcgg ccgcaaggcc cctgcagtgg tgtttgccga cgtcgacatc
781 cagcggaccg cccgcgaaat cgccttgggt gccttcttca acgcaggcca ggactgcact
841 gccgttaccc gtgtgctggt ccaccgggac atccaccgg agttcgcaac ggcacttgcc
901 gatgtgcct ccgcctgctg tgtgggggag gacctggggc cgtcaacag ccgcgcacag
961 ctggagcgcg tggagggttt catgaccgcg ctcccggcca acgccaccgt gctgaccggc
1021 ggcaagcgca ccggcaccgg gtactacttt gaaccgacgg tcattgacgg tgttttccaa
1081 agcgatgaag tggctctcga cgagatcttc ggaccctgac tcacagtcca gcccttcgga
1141 accgaagacg aggccttggg gctcgccaac ggcaccaa atgccttggc ctccagcgta
1201 tggtcgcgga atcacggcgt ggtcacgcgg gtttccaaac aactcgactt cggagcgggtg
1261 tggatcaact gccaccaggt gatcccggca gagggcggcc acgggggttt caagcattcc
1321 ggcacgggca aggacctctc cgtattcggg cttgaggact acaccgcgat caagtccgct
1381 accaggtccc accgctag

```

### 15) *nylE<sub>13</sub>*

```

1 ttgcacaccg tggttcaaac cttgcagaac ttcataacag gcgagttcgt caccgccgta
61 ggtacgggtc tcctggacat cgtcaacccc gccaccgggg acgtcgtggc caagtctccc

```

121	gtttcgggtgc	aggcagatgt	tgacgctgcc	atgtccgcag	ccagcgaggc	tttcaagacc
181	tggaagcacg	tcacaccggg	acagcgccag	ctcatgctgc	tgaagctggc	cgacgccatc
241	gaggccaaca	gcgacgaact	cgtcgaagcc	cagcaccgca	acaccggaca	ggtccgttcc
301	ctcatcgctg	ccgaggaagt	tgctgccggc	gccgaccagc	tgcgcttttt	cgccgggtgca
361	gcacgactcc	ttgaaggcaa	gtccggccgt	gagtacttcg	agggccacac	ctcctatgtg
421	cgccgcgagc	ccattggcgt	cgtagcccag	gttgctccgt	ggaactaccc	gttccctcatg
481	gccatctgga	agatcgggcc	cgccctggcc	gcaggcaaca	cggtagtcct	gaagccctcc
541	gataccaccc	ctgaatccac	cctggctctg	gcacgcctgg	caggggagat	cttcccggcc
601	ggcgctcctca	acgtggtcct	cggcaccggg	gagaccggcg	cgatgatggg	ggagcacaag
661	gttcccggac	tgggtgtccat	caccggttcc	gtccgcgcag	gcattgccgt	ggccagcggc
721	gccgcgaagg	gcctcaagcg	cgcgcacctg	gaactgggcg	gcaaggcccc	ggccatcgct
781	ttcaaggacg	ccgacatcaa	gaagagcgcc	gcggccatcg	cgggaattcg	cttcttcaat
841	gcccgtccag	actgcacggc	catcacccag	gtgctcatcg	aagacgagat	ccacgacgac
901	atgggttgccg	ccctggtgga	gcacaccaag	accctccaga	cgggctcgca	ccgggagcaa
961	gacaactact	tcggccccgt	caacaacgtc	aaccacttca	acgccgtgac	ctccgtgggtg
1021	gagaacctcc	cggcgcactg	caggatcgaa	accggcggac	accgcgcagg	ggagaagggc
1081	ttcttcttctg	agcccacccat	catctccggg	gccaagcaga	gcgatgacat	cgtccagaag
1141	gaaacgttctg	ggcccgtcat	cacgggtccag	aagttcagct	ccgaagccga	agccctcgaa
1201	ctggccaacg	acgtcgaata	cgccttggct	tccagcgtct	ggaccaccga	ccacggcacg
1261	gccatgccga	tgagccgcga	cctcgacttc	ggcgccgtgt	ggatcaacac	ccacatcctc
1321	ctgaccgcag	agatgccgca	cgggtggcttc	aagcagtcgg	gttacggcaa	ggacctctcc
1381	atgtacggcg	tggaggacta	caccgcgcat	aagcacgtca	tgagtgcact	ggacgcataa

#### 16) *nylE<sub>14</sub>*

1	atgggtgcg	agctttcaca	ctacgtaggc	ggccaaagga	tcgacggcac	gtccggccgg
61	ttcagcgatg	tctacgatcc	ctgcaccggc	gaagtccagg	cccgcctgcc	gctggccagc
121	gccgaggagg	tgcgcaacgc	cgtcgcgaa	gccgagaagg	gccaactcga	atgggctgcc
181	atgaatccgc	agcggcgggg	tcgcatectg	ctgaagtctg	tggacctcgt	caatgacaac
241	atggacgagc	tggccaagct	cctgtcctcc	gaacacggga	agacgttcgc	ggacgccaag
301	ggtgatatcc	agcggggcat	cgaagtgggtg	gagttctccg	ccggggcgcc	gcatctgctc
361	aaaggcgaat	tctcggacag	cgcaggccag	gggatcgatg	tccactccct	gaggcagccg
421	ctgggtggtg	ttgccggcat	tacgcccttc	aacttccctg	ccatgattcc	gttgtggaag
481	tcgggaccgg	cgtctcgctgc	cggcaactcc	ttcatcctca	aaccgtccga	gcgggacccc
541	tccgtgccgc	tgccggctgc	cgagctctac	agcgaagccg	gcgttccgga	cggcgtcttc
601	aacgtcatca	acggggacaa	ggaagccgtg	gacgcccttc	ttgaggacct	gagggccaag
661	gcaatcggtc	ttgtcggttc	cacgcccgtc	gcccagtaca	tctacgccac	ggccgcccgc
721	catgggaagc	gcgcacagtg	cttcggcggg	gcgaagaacc	acatggtgat	catgcccgcg
781	gccgacctgg	acatggccgc	ggacgccctg	attggtgccg	ggtacggttc	cgtctggagag
841	cgggtgcatg	ctatctccgt	agccgtcccg	gtgggcccag	aaacagcgga	cgccttctgt
901	gccaagctca	ccgagagggt	taaggaaactc	cgggtcgggc	acagcctgga	caaggacgcg
961	gaattcgggc	cgggtggtgc	ggcgtctgcg	aaggaaacgga	tcgagggcta	catccagttc
1021	ggcgtggagc	agggcgccac	cttgggtggca	gacggccgcg	gctcaccgtg	tgagggatatac
1081	gacggcggct	tctgggtagg	ccccaccctc	ttcgacaacg	tcaccaagga	tatgaagatc
1141	tacaaggagg	agattttctg	tcctgtcctg	agcgtcctcc	ggcgggccga	ctacgacgaa
1201	gcgtcaggc	tctgcagcga	gcacgagttc	gggaacggcg	tcgcaatctt	taccgcgcgac
1261	ggcgactccg	cccgcgactt	cgccagccgc	gtggaagtgg	gcatggtggg	catcaatgtt
1321	cccatccccg	tgccgattgc	ctactacacg	ttcggcgggg	ggaaggcgct	cgggttcggc
1381	gacctcaacc	agcatggcgc	ggatgccttc	cgttcttaca	ccaagacca	gaccgtcacc
1441	tcgcgggtggc	cctccgggat	ccgccagggc	gccagctttg	tgatgccggc	aggcagctga

#### 17) *nylE<sub>15</sub>*

1	gtgctgttca	agttccgtga	actggtcgca	gcccacgtgg	acgaactcgc	tgaactgatac
61	acggccgagc	acggcaaggt	cctctccgac	gccaagggcg	agatcgggccg	tggcctggaa
121	gtcatcgagt	tcgcctgcgg	catcccctcg	ctgctcaagg	gtgactactc	ggaccaggtc
181	tccaccggca	ttgatgtgtt	ctccttccgc	gaaccgttgg	gcgtgggtggc	cgggtattacc
241	ccgttcaact	tcccggtgat	ggtgccgttg	tggatggcac	cgatggccat	cgccaccggg
301	aacgcgttca	tcctcaagcc	ctcggagcgg	gacccgtccc	cgtcgtctgt	gctggccaag
361	ctgtggcagg	aagcgggcct	tccatgatgt	gtgttccagg	tccgcaagcg	cggcaagaa
421	accgttgatg	ggctgttgac	gcaccgggac	gttgacggca	tctccttcgt	gggctccacc
481	ccgatcgccc	agtacgtcca	cgaaccggcc	acgaagcacg	gcaagcgggt	ccaggcactt
541	ggtggggcga	agaaccacgc	gatcgtgctc	ccggacgctg	acctggacaa	cgcgcgggac
601	cacctcgccg	ccgctgcttt	cggctcggcg	ggggagcgct	gcatggcgat	ctccgtggcc
661	gtcgccgtcg	gggacgcgcg	tgacctgctg	gtgaagaagg	tcgaagaacg	cgccttggcc

```

721 gtgaaggtca acaacggcac cgaacccggc gccgaaatgg gcccggtcat ccccccgcc
781 tcgaaggaac gcatcgtaa gatcgtaacc gaagcagaaa gcgcgggtgc cgcgatggtg
841 gtggacggac gtgacctggt cgtcccaggc cacgaagacg gcttctgggt agggcccacc
901 gtgatcgacc acgtcaagac cgaaatgacc gcctacaccg aggaaatctt cggacccgtc
961 ctggtggtgg tccgcgtgga caccctcgaa gacggcatca agctgatcaa ctccaacccg
1021 tacggcaacg gcaccgcgat ctacacctcc tcgggagcgg cggcacggaa gttccagcgc
1081 tcggtcaccg tgggcatgat cgggatcaac gtgccctgac ccgtcccggg ggccctaccac
1141 tccttcggcg gctggaaagc ctccctcttc ggcgacaagc acatctacgg acccgaaggc
1201 gtctccttct acaccgcgg caaggtagtc acctcccgtt ggcccgaaac ccaccacgcc
1261 tccggcgcct cctacaactt cccctccaac tag

```

#### 18) *nylE<sub>16</sub>*

```

1 atgacttcca caactctgga tactgcctc accgccgagg ccaccctcac cgcccagcac
61 ctcatacaacg gccaatggct cggcgaaggc gtcacccggc gcatgaaccc cgcccgctccg
121 gatgagctcg cagcgctctc acccagcggg agcgccgagg acgtcgacgc cgccatcacc
181 gcgcgcgcgc ctgccagcc cgcgtgggct gcgtcccggc cccctcccgc tggcgccatc
241 ctccctgccc cggggaacct gctgatcgaa cgccaggggg ccatcgccga agacctggtc
301 cgggaagaag gcaagaccct ggcagaagcc aaggggcgaag tgaagcgcgc ctcggaactc
361 ctgcgcttct tcggctccct cggctgggct gccaccggcg aagtcctgcc cagcggactc
421 ccggacacca ccatcaccac ccgcgcgcaa gccctgggcg ttgtaggcct gatcacgcc
481 tggaaacttc ccatcgccat tcctgcgtgg aagaccgcac cggccctgat cagcggcaac
541 accgtggtga tcaaaccggc tgagctcact cccctctccg ccaccacct cgcccggcg
601 ttcagcaccg caggcctccc tgccggcggt ttcaacgtcg tccacggcaa gggccgggtt
661 gttggtgacg cactggcccgc gatccccgc atcgccgggc tgtccttcac cggttccacc
721 aacgtgggccc tgggattgca ggaaatcctc aacggccgcc gtgccgggt gcaactggaa
781 atgggcggca agaaccggct cctggctcct gacgacgcgc acccccgcaa ggccgcgcaa
841 gtggtggccg ccggagcatt cgggctcacc ggtcaggcat gcacggcaac ctgcgggtg
901 tacgttacc cccggatccg tgcagcgttc cttgacgcgt tgggtggcga agccgccact
961 taccgaccg gtgacggcct ggcggaaggc acccgatgg gcgcgtggt gagcgccag
1021 caattcgagc aggaccaggc agcgggtgcg accgcgtcg aacgcggcgc aagcctcctg
1081 caccgcaact acgacggcga cccctccggc gcgtgctct tcccggcggc ggtgctcacc
1141 gacctgccct cggacgacct cgcagtcacg gaagagatct tcgggcccgt agtggccgtg
1201 ctggaagtcc ccgactacga ggcaggcctt gccgcgctca acgactcccg ctacggactc
1261 accgcgggca tctgcaccga ttccctcgcc ctgccacgg acttcgccc cctgtgcgag
1321 gccggcgtgg tcaaggtcaa ccggccact gctggcctgg acctcaacgt ccggttcggc
1381 ggggtcaagg actcctccac caacacgttc cgcgaacaag gacggtccgc cctggacttc
1441 ttcacgtggg gcaaaaccgt ctacacgggc gtgtag

```

#### 19) *nylE<sub>17</sub>*

```

1 ttgagtacag caactcttga cctgacggcg gtcacgcaag cagcggcagc cgcttcaaa
61 gtgaccgcag cagcttccga cgccgaacgc gccacgtggt tgaccgccgt cgccgacgcg
121 ctggacgcga acgtgaacga actcgtggcc attgccgatt ccgaaaccag cctcggcaca
181 gtccgcctgg cgggggaagt ggcgcggacc agcgggcagc tgcggttgtt cgccaaggtg
241 atcaccgagg gctcgtacct cgaagcggct attgaccatg ccgatccggg cgccaccccg
301 cccaagccag acctgcgcgc catcctcagg ccggttgggc ccgtagccgt gttctcggc
361 tcgaactttc cgttcgcgtt ctccgtggca ggcggagaca ccgcctcagc gctcgcgtc
421 ggctgccccg tgatcgtgaa ggcccaactc gggcaccttc gcctctccga cgggaccgcg
481 gaaatcgtca gcgagggcgt cgtgggagca ggcgcgcgcg agggatatct cgcgctggtc
541 agcggacggg aagccggcac tgccctggtc caggatcccg ccatcaaggc cgtcggcttc
601 acgggttcca ttcccggcgc gcgcgcactg ttcgacctcg ctgtttcgcg cccggacccc
661 attcgtttct acggggaact gggcagcctg aaccccggtg ttatcacgga agcggcagtg
721 gccgaacggg gcgaggaact cgccgcgggc cttggaagtt ccttcacat ggggtccggc
781 cagttctgca ccaaaccggg actcgtcttc atcccagccg gcaccgactt cgccgcgcac
841 ctggccgaag ccagcaagga caagcccgcg gcagcgatgc tgaccgaacg catcgcggaa
901 gcgttcccgc acgggctgcg gggcgtcgcc gagttgcccg gcgtcacgct ggtcagcgga
961 accgctgagc aggatgcgct tgccgacggc gccgcccccg tggttttcgc gaccaccgcg
1021 gcgaacgtgg tggagcggcc ggaggagctg ctggaggagt gcttcggccc caccacgtg
1081 ctcatcgagt acgccaacca ggatgagttg tcgcaggccc tcgccaaggt accggcagc
1141 ctgaccgcca ctgtccactc ccagccgggc gaggacatct ccgctttggt ggagcaactg
1201 agcgaactgg ccgggcgtgt gctgttcgcg ggggtggccta ccggcgtcgc ggtgaactgg
1261 gccagcagc acgggggccc ctaccgggcc accacctccc tcttcacctc ggtgggagcc
1321 acggctgtgc gccggttcca gcggcctgtt gcctaccagg acgctcccga aagcatcctg
1381 cccccgccc tgcacgagtc caaccgcgtg ggtatcccgc gccgggtgga cggcgtgctc

```

1441 cagcttggct aa

20) *nylE<sub>18</sub>*

```
1 atgcaagccc aaaaagaaat cgtggaagga gggacaatgt tcaccacagt cgaggaaaca
61 aacaccagga ccaccgccgc ccacgcggcc tacgaacaag caagggacat cgacccgggc
121 acgcgtgccg catggttaag gggcatcgcc gctgcattgg aagcgaatgc agatgagctg
181 gtggccctgg gacaagaaga aaccacttg gacgagggaa ggctttcctt cgagctcaag
241 aggtccgtct tccaactacg gttgttcgcg gaggaggtcg tccggggaga acacctggac
301 gcaaccatcg accacgccga tccgacgtgg gggatgggtc cgcgccgga tatccgtcgc
361 gtctccgtgc ctctgggcgt cgtaggcgta ttcggggcct ccaacttccc cttcgcgttc
421 agcgtcatgg gtggagacag tgcattctgcg ctgcgcgccg ggtgtgcagt ggtgcataag
481 atccacgaag gccacctgca gcttgccctg cgcacaggtg cgatcgtgga ggaagcgttg
541 gaatcgggtg gtgctccgca ggggcttttc tccaccatca tcggacgggc ggcggtgaa
601 tgccctgggtg accacccggt ggtaaaggct attggcttca ctggttccac cgccggagga
661 agggcgctgt tcgaccgggc ggcacgacgt tccacacca tccctttcta cggagaactg
721 ggcagcatca accctgtgtt cgtcactgaa gctgcttgga agttgcgcgc cgatgagatc
781 ctggccggtt tcgctcgtc gtctactatg gggatgggca aattctgcac caaacctggg
841 cttctctttg tcccggggta ctctccgcc ttaaccggca acggtgatga cgtctctgac
901 attctcaatc gggaagtcgc aggaagccg cgccgccgcg tccttagccc cagactgcgg
961 gaaggcttcg atcgggcccgt ggaaaccgtg cgggcccgcac ccggcgtaga cgtgctgttg
1021 gcaggggacg attccgaggg gccccaccct actatcctga agaccacggc tgatcacgtc
1081 cgcaaacatc ccggaatcct tgaacaggag atgttcggac cggtgcggg agtagtgag
1141 tatcaccacg gtgatgacct ggtctccctg gcaggattaa tgggtgggca actgaccggc
1201 accgttcatg ccgaacccca cgaagacgtc tcggatctgc tgtccactct gcgggaacgc
1261 tgccggccggt tgctgtggaa cgctggccc acaggtgtga cggtgagcta tgcacagcac
1321 catggcggtg cctaccgggc caccacggca accaccacgt ccgtgggaac ggccggcatc
1381 gctcggttca tgccgggtgt ggccacgat tccttcccgc cgtcccaact gccggcaccg
1441 ttgctgatg acaatccgtg gcggtccgg cgccgggtgg atggagcttg ggattacca
1501 atcccggag gaaaagtcag tgaataa
```

21) *nylE<sub>19</sub>*

```
1 gtgcctcgga aggaccgtc gacgatgacc actacagcag tcgccccgga aaccacagac
61 gttgccaccg tcccagcta cgttcaggac gctggtgga ccccgccgc cgaagccaag
121 accgtgcccg tgcgtgatgc cagcaccggc gaagtccctg ccaacgtgag caccgacggc
181 ctggaccttg ccgccgtcgt gaactacgga cgcaccacgg gccaagcgga actcggcaag
241 ctgacgttcc accagcgcgc cctcaagctc aaggagctgg ccagtagctt gaacggccgc
301 cgcgaagagc tctacgcgca gtctctcgca tccggcgcca ccaagatcga caacatgatc
361 gacatcgacg gcggcatcgg cgtgctcttc acattcggtt ccaagggccg gcgtgaactg
421 cccaactcgc aggtgatcgt ggacggtccc atggaggtcc tgtccaagga cggttcgttc
481 gccggcgagc acatctatac ccgcattccc ggcgtagccg tccagatcaa cgctttcaac
541 ttcccgggtc gggggatgct ggagaagttc gcgcgcctc tctcgcggc cgtgccaaac
601 atcgtcaagc cggcaacgcc caccggctat gtccgcgcgg ctgcctgtaa ggccatcgtc
661 gaatccggca tccttcccgc aggttcgctc cagctgatct ccggttctgc ccgcacgctc
721 ctggacgaac tcgactaccg cgacctcgtc tccttcaccg gttccgcgc aacggcgaag
781 tcgctgaaat cgcaccccaa cgtggtgcag ggccgcgtcc gcttcacctc ggagacggac
841 tcgctgaacg cggccatcct cggccccgac gccgtccccg gcacccccga gttcgacgct
901 ttcgtcaagg ccgtcgtcac cgagatgacc gtcaaggcgg gccagaagtg caccgccatc
961 cgccgcgtgc tcgtcccaa ggagctgacc tccaggtcgc ccgcagccat cggcaccgcg
1021 atcaacgaac gcgttggtgt cggtgacccg cgcgcgaag gcgtcaccat gggcgccctc
1081 gcctcgctgg agcagctcgc cgatgttcgc gcggcgctcc aggaatgct cgacgcggc
1141 ggtgagcttg cgtacggaag tctcgattcg ccgtcggtca cctccgtcgg cggcaccgtc
1201 ggcgtagtgg aggacggcgc ctccatggct ccggtgctcc tcagctgggc tgacgcggaa
1261 gccgaagcag tccactccct cgaagccttc ggaccggtt ctccgttct tggtacacc
1321 gacctcgccg acgcctgctg cctcgctgcc cgcggttccg gctcgctggg ggccctcgtg
1381 tgcaccaacg atcccgcagt ggcccggtga ttggttaccg ggatcgagc ccaccacggc
1441 cgcgtccaca tgctcaaccg tgaagacgca cgtcttcca ccggtcacgg tcccccggt
1501 ccgcacctgg tccacggcgg ccccgccgcg gcaggcgggc gcgaagaact gggcggtatc
1561 cgcctgtgtc tgcaccacat gcagcgcacg gccatccagg gttcgccgaa catgctcacc
1621 gcggtcaccc gccagtggca caccggtgcc gaccggaact tcaccatcga aaccgagggc
1681 gagcaccctg tccggaagca cctgtcgacg ctgcgcgtcg gcgatgccgt tcgttccgag
1741 ctccgccagg tcacgcttga ggacatcacg gccttcgcaa actccacggg cgataccttc
1801 tacgcccaca ccaaccagga agccgcgcag gccaaaccct tcttcccggg catcgtggcg
1861 caccggttacc tgctcctgag ctgggctgcg ggtctgttcg tggagccggc tccgggtcct
```

1921 gtccctggcca actacggatt ggagaacctg cgcttcatca cgccgggttg cgccggcgac  
 1981 tccatccggg tgaccctgac cgccaagaag atcacgccgc gtgaaacgga cgagtacggc  
 2041 gaggttgccct gggtatgcagt cctaaccaac cagaacgacg acatcgtagc cacctacgac  
 2101 gtccctcacc tcgtggagaa gtaa

## 22) *nylE*<sub>20</sub>

1 gtgcccacgt tcctcccgtg gtacatgcgc ggcgccgtcc ggcgcggcgg gatcatggct  
 61 ccgatcatgc cccaggtggt cattcccac gcacgccgcg tactccgcga aatggtgggc  
 121 caccgtattg ttgatgccac cgatgccaa ctccgtccgg ccacgccaa aatcaagcag  
 181 gacggcgctc accttaattg gaacctcctg ggcgaagcgg tccctggcga gcacgaggcc  
 241 cagcgctcgtc tggacggcac gttgaagctc ctggcccgcg aggacgtgga ctacgtgtcc  
 301 attaaggaat cctccaccgt ggccccgcac tccccgtggg ccttcgacga ggcagtggac  
 361 cacgtggtgg agaagctcac ccgcctctac cgccctggcag cgtccttccc caagccgaag  
 421 ttcatacaacc tggacatgga ggaatacaaa gacctcagca tgaccatcgc cgtgttcaag  
 481 cggatcctgg atatgcccga gttcctgaac ctcgaggcgg gcacgtcct gcaggcctac  
 541 ctcccggacg cctcggcgcc catgcaggaa ctgcaggaat gggccgcgcg acgcccgcgc  
 601 aggggtggtg cgcctcaca ggtgcgtgtg gtcaagggtg ccaaccttcc catggaacag  
 661 gtggaagcgt cactccacga ctggccgctg gccacgtggg gcagcaaaac ggattcggat  
 721 accagctaca agagcgtcat caactacgcc ctaccccctg agcacattga cgccgtccgc  
 781 atcggcgctc cgggacacaa cctcttcgac gtccgttttc cctggctcct ggcgaagcag  
 841 cggggcgctc ctgaaggcat cgagttcgag atgctgctcg gcacgtggc cggccaggcg  
 901 accgtgttcc ggaaggacgt cggcagcctg ctccctctaca ctccggtggt ccaccgggt  
 961 gagttcgatg ttgccatcgc ctacctgat cgccgtctcg aagagggagc cagccaggaa  
 1021 aacttcatgt ctgcctgtt cgagctcagc gacaatgaac cgtctctcga acgtgaaaag  
 1081 cagcgttttc tgaactccct cgccaacctg agcaggagac tgccggagcc gaaccgcaag  
 1141 caggaccgcc gccttccggc tgagcccgcc ccgaccgagg gcttccgcaa cccccggac  
 1201 accgaccccg cctcccggc caaccgggccc tggggccgcg acatcctggc gcgcacccc  
 1261 ggctccacgg cgggtaacgc aatcgtcgag tccaccaagg tatccgacgc cgccgaactc  
 1321 gaacgcgctg agctcgcgag cctogaagca ggcaaggcat ggggtgccc cccggagcc  
 1381 gagcgtgccg cgatcctgca ccgcgcggg gacatcctcg agtcccgcg ggcgagttg  
 1441 ctcgaggtga tggcctcga aaccggcaag accctggacc aaggcgatcc cgaagtcagc  
 1501 gaggcgatcg acttcgcgca ctattacgcc gaacgcgcca aggatttgga agcggctcag  
 1561 ggcgccacgt tcgtcccggc caacctcacc gtagtgacac ccccggtgaa cttcccgtg  
 1621 gcgatccccg caggtcgcac gctcgcagcg ctgcctcag gttccgcct cgtgatcaaa  
 1681 ccggccaagc agggccgccc ctccggttcc gtgatggtg acgcgtgtg ggaagccgc  
 1741 gtgccgcgtg agctcgtggc gctcgtgag ctogaagagc gggagctgg ggcgagttg  
 1801 gtgtgcacc cgagcgtgga ccgcgtgatc ctgaccggtg gttacgaaac cgcagaactg  
 1861 ttccgttcc tccgccagga ccttccgctg ctggcggaac cgtccggcaa gaacgccatc  
 1921 atcgtcacc cgagtgcgga ccttgacctg gccgccaaag acgtcgtgta ctccggttc  
 1981 ggccatgcc gccagaagtg ctccgcggcg tccctcgtga tccctgtggg ttccgttg  
 2041 aagtcaccag gcttccacaa ccagctgatc gacgcgcgc ggtccctcac cgtgggctac  
 2101 ccggaacaac caaccacgca gatgggtccc atcatcgagc ccgccaacg caagctcctc  
 2161 aacgccctga ccaccttgg cgaaggggaa acctgggccc tcaaaccgac acgcctcagc  
 2221 gggacgggccc gcttgtggtc cccgggcatc cgttccggcg tcaagcgcg ctcctacttc  
 2281 cacctgacgg agttcttcgg accggtgctc ggagtcata ccgccgagac cctggaacaa  
 2341 gccatcgcca tccagaacga gatogaatac ggcctcaccg ccgggctgca ctccctggat  
 2401 tccgccgaaa tcggcacctg gctggagacc atccaggccg gcaacctgta cgtcaaccga  
 2461 ggcatcaccg gtgcgatcgt ccagcgccag cccttcggcg ggtggaagaa gtccgctgtg  
 2521 ggtgccggga ccaaagccgg tggcccgaa tacctcatcg gcctgggcaa ctgggtgcc  
 2581 gcagaggcac acgccaagcg cggcacctgc ctgcagggtg ccgctgcgga gattctcgcc  
 2641 gcagcgaagt ccgtggacgt caccggcgag gagctccgcg tccctggagc gtcgctgttc  
 2701 agtgacgcc acgcctgggc gagcaggttc ggtaccgcga aggacgtctc cgccctgacc  
 2761 gcggagcgga acgtcttccg ctaccgtccc atcccggtc ctatccgcct ctccgaaggc  
 2821 gagcggatcg ccgacctgct gcgggttgtc gcggccggcg cagtggccgg ttcggcactc  
 2881 aaggtgagct ccgccgtcgt actccggag gccgtggtga gcgtatttgc gaacctgaac  
 2941 gtcagcgctc ggatcgagga cgacgcgcg tggctggccc gcgcagcaac gttcgacggc  
 3001 ggccgcaccc gcctgatagg tggcgacttc accgcgctga gcgcggcgac cgggtggcgt  
 3061 ccggacatcg ctgtgtacca cggcgccgtg acccaggccg gtcggatcga gatgctgcc  
 3121 ttcctccgcg aacaggccgt gtccatcaca gccaccgct tcggcaccac gaaccatctc  
 3181 tcggacgggc tgatctag

Fig. 4-7 Nucleotide sequence of *nylD* and *nylE*.

#### 4.6.3 NyID および NyIE の系統的解析

##### 4.6.3.1 NyID の系統的解析

PLP 依存性アミノトランスフェラーゼは系統学的に 4 つのクラスに分類されていたが、最近になりさらに 5 つのサブグループに分類された。サブグループ I と II は芳香族およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが、サブグループ IV には分枝鎖アミノトランスフェラーゼが、サブグループ V にはセリンおよびヒスチジノールリン酸アミノトランスフェラーゼが含まれる。系統学的解析により、NyID<sub>1</sub> および NyID<sub>2</sub> はサブグループ III に属することが明らかとなったが(Fig. 4-8)、このグループには GABA アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.19)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ(OAT; EC 2.6.1.13)、 $\omega$ -アミノ酸-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ(OAPT; EC 2.6.1.18)、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ(ACOAT; EC 2.6.1.11)、7,8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ(DAPAT; EC 2.6.1.62)、2,2-ジアルキルグリシンデカルボキシラーゼ(DGD; EC 4.1.1.64)およびグルタミン酸 1 セミアルデヒドアミノムターゼ(GSAT; EC 5.4.3.8)が含まれる(Table 4-18)。NyID<sub>1</sub> および NyID<sub>2</sub> はともに GABA アミノトランスフェラーゼに系統学的に関連していることが確認された。NyID<sub>1</sub> は *Arthrobacter aurescens* の GABA アミノトランスフェラーゼ(Ara-GABT)と 95%の相同性を持つことが確認されている。さらに、NyID<sub>1</sub> は他生物の GABT、すなわち *Rhodococcus* (Rho-GABT), *Mycobacterium* (Myc-GABT), *Streptomyces griseoruber* (Str-GABT), and *E. coli* (Eco-GABT)とそれぞれ 73.0, 62.5, 54.6, and 42.8%の相同性を持つことが確認された。NyID<sub>1</sub> および NyID<sub>2</sub> は同じ菌株におけるアイソザイムであるが、NyID<sub>2</sub> は NyID<sub>1</sub> と比較的その相同性に大きな差があった(相同性: 49.8%)。

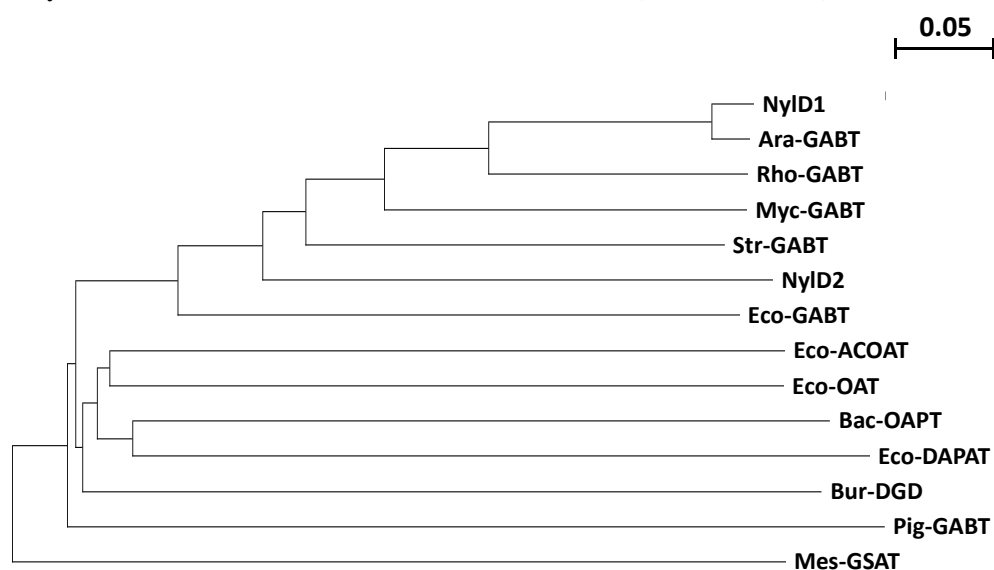


Fig. 4-8 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of NyID.

Table 4-18

List of enzymes used for phylogenic analysis of 6-aminohexanoate aminotransferase (NylD)

Notation	Origin	Product	Protein I.D.
Ara-GABT	<i>Arthrobacter aureus</i>	GABA- aminotranferase	ref WP_011775705.1
Bac-OAPT	<i>Bacillus anthracis</i>	Omega-amino acid:Pyruvate aminotransferase	gb KT861634.1
Bur-DGD	<i>Burkholderia cepacia</i>	2,2-dialkylglycine decarboxylase	pdb 1DKA
Eco-ACOAT	<i>Escherichia coli</i>	Acetylornithine aminotransferase	up P18335
Eco-DAPAT	<i>Escherichia coli</i>	7,8- diaminopelargonic acid synthase	ref NP_415295.1
Eco-GABT	<i>Escherichia coli</i>	GABA- aminotranferase	up P22256
Eco-OAT	<i>Escherichia coli</i>	Ornithine aminotransferase	gb AJE57644.1
Mes-GSAT	<i>Mesorhizobium</i> sp. LUK	Glutamate-1- semialdehyde aminotransferase	gb ABL74379.1
Myc-GABT	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	GABA- aminotranferase	ref WP_003894337.1
Pig-GabT	<i>Sus scrofa</i>	GABA- aminotranferase	pdb 10HV
Rho-GABT	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	GABA- aminotranferase	ref WP_020906042.1
Str-GABT	<i>Streptomyces griseoruber</i>	GABA- aminotranferase	ref WP_055637776.1



#### 4.6.3.2 NylE の系統的解析

アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)スーパーファミリーは様々な原核/真核生物に分布する多様なタンパク質ファミリーより成る。約 20,000 遺伝子が系統的に ALDH スーパーファミリーにおいて、少なくとも 13 のファミリーに分類されると予測されている。系統的解析により、NylE<sub>2</sub>、NylE<sub>4</sub>、NylE<sub>5</sub> および NylE<sub>8</sub> は様々な生物において確認されているコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼファミリー(SSALDH) に分類された(Fig. 4-9)。これに対し、NylE<sub>1</sub> はアジピン酸セミアルデヒド(6-oxohexanoate)デヒドロゲナーゼ(Rho-ChnE; *chnE* gene from *Rhodococcus*)と最も高い相同性(63.5%)があった。われわれは、NylE<sub>1</sub>、NylE<sub>3</sub>、NylE<sub>6</sub> および ChnE は明確に異なる枝に分類されると考え、このグループを新たに”アジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ASALDH)サブファミリー”と定義した。

このほかの NylE について、NylE<sub>12</sub> および NylE<sub>13</sub> は  $\gamma$ -アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ABALDH)サブファミリーに、NylE<sub>17</sub> および NylE<sub>18</sub> は  $\alpha$ -ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(AKGSALDH)サブファミリーに、NylE<sub>7</sub> および NylE<sub>9</sub> は 5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CHMSALDH)サブファミリーに、NylE<sub>11</sub> はベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ(BALDH)サブファミリーに、NylE<sub>14</sub> および NylE<sub>15</sub> はメチルマロニルセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(MMSALDH)サブファミリーに、NylE<sub>20</sub> は Tugor アルデヒドサブファミリーに、NylE<sub>19</sub> は  $\gamma$ -グルタミルセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(GGSALDH)サブファミリーに分類されたと考えられた。NylE<sub>10</sub> は Taniyama et al.(2012)によって提唱された”グループ X”サブファミリーに分類されたと考えられた。NylE<sub>20</sub>~NylE<sub>20</sub> でグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に分類されたものはなかった。

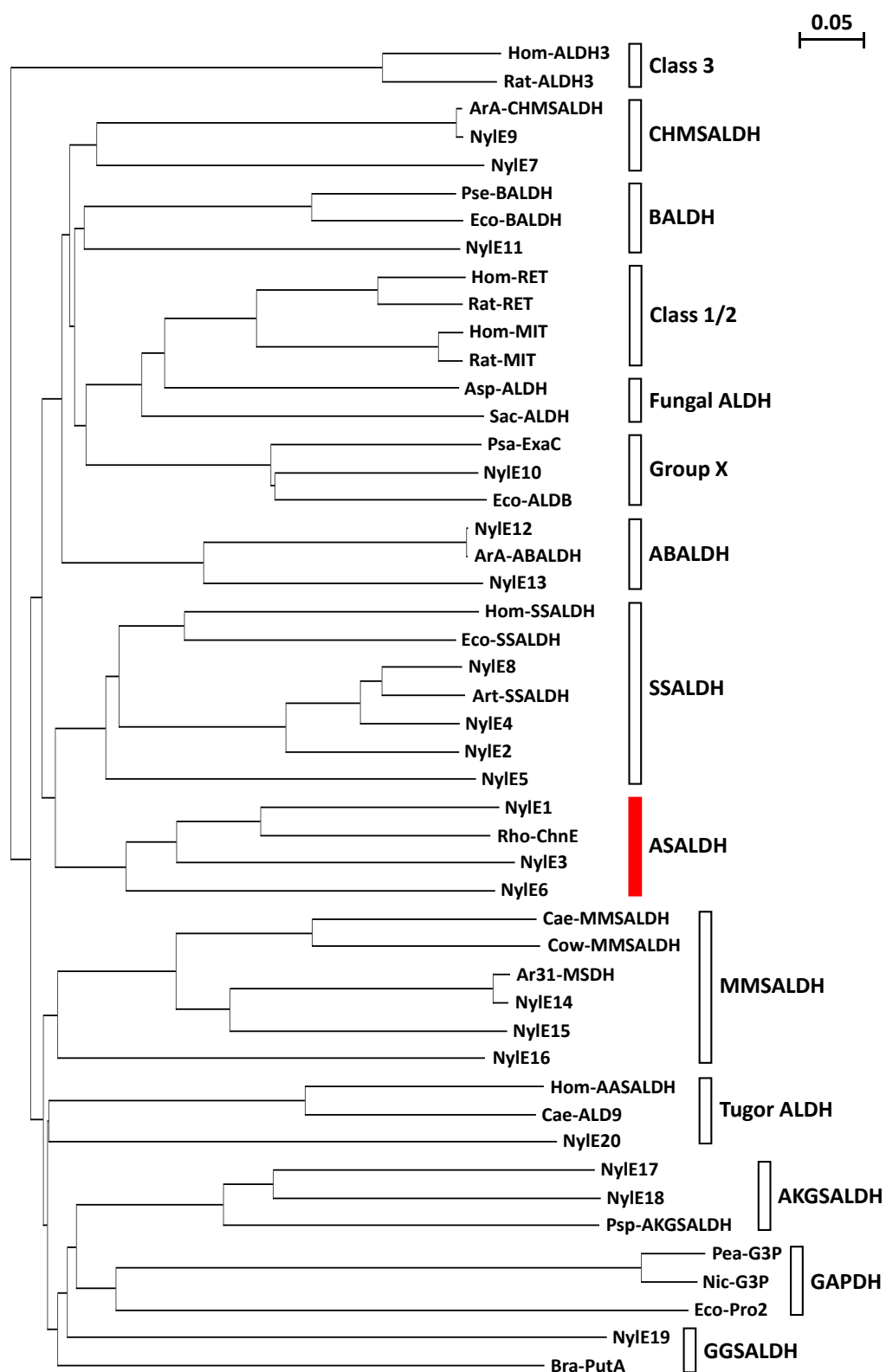


Fig. 4-9 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of NylE.

Table 4-19

List of enzymes used for phylogenic analysis of adipate semialdehyde dehydrogenase (NylE)

Notation	Origin	Product	Ptotein I.D.
Ara-SSALDH	<i>Arthrobacter aurescens</i>	succinate-semialdehyde dehydrogenase	ref WP_011777164.1
ArA-ABALDH	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 21022	gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	ref WP_062095136.1
ArA-CHMSALDH	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 21022	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	ref WP_062096803.1
Asp-ALDH	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	aldehyde dehydrogenase	ref XP_001392844.1
Ar31-MSDH	<i>Arthrobacter</i> sp. 31Y	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	ref WP_024819314.1
Bra-PutA	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	ref NP_773901.1
Cae-ALDH-9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Putative aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 homolog	ref NP_498263.2
Cae-MMSALDH	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Probable methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	ref NP_001022078.1
Cow-MMSALDH	<i>Bos Taurus</i>	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating],	ref NP_787005.1

Eco-ALDB	<i>Escherichia coli</i>	mitochondrial precursor aldehyde dehydrogenase B	ref NP_418045.4
Eco-BALDH	<i>Escherichia coli</i>	betaine aldehyde dehydrogenase, NAD- dependent	ref NP_414846.1
Eco-SSALDH	<i>Escherichia coli</i>	succinate- semialdehyde dehydrogenase I, NADP-dependent	ref NP_417147.1
Eco-Pro2	<i>Escherichia coli</i>	pyrroline-5- carboxylate reductase, NAD(P)-binding	ref NP_414920.1
Hom-AASALDH	<i>Homo sapiens</i>	alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase isoform 1 precursor	ref NP_001173.2
Hom-ALDH3	<i>Homo sapiens</i>	aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP- preferring isoform 1	ref NP_000682.3
Hom-MIT	<i>Homo sapiens</i>	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor	ref NP_000681.2
Hom-RET	<i>Homo sapiens</i>	retinal dehydrogenase 1	ref NP_000680.2
Hom-SSALDH	<i>Homo sapiens</i>	succinate- semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 precursor	ref NP_733936.1
Nic-G3P	<i>Nicotiana attenuate</i>	glyceraldehyde-3- phosphate	ref XP_019238699.1

Pea-G3P	<i>Glycine max</i>	dehydrogenase, cytosolic glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, cytosolic	ref XP_003523131.1
Psa-ExaC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NAD+ dependent aldehyde dehydrogenase ExaC	ref NP_250674.1
Pse-BALDH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	betaine aldehyde dehydrogenase	ref NP_254060.1
Rat-RET	<i>Rattus norvegicus</i>	retinal dehydrogenase 1	ref NP_071852.2
Psp-AKGSALDH	<i>Pseudomonas putida</i>	Alpha-Ketoglutaric Semialdehyde Dehydrogenase aldehyde	ref WP_010952390.1
Rat-ALDH3	<i>Rattus norvegicus</i>	dehydrogenase, dimeric NADP- preferring aldehyde	ref NP_114178.1
Rat-MIT	<i>Rattus norvegicus</i>	dehydrogenase, mitochondrial precursor	ref NP_115792.1
Rho-ChnE	<i>Rhodococcus jostii</i>	6-oxohexanoate dehydrogenase	gb ABH00320.1
Sac-ALDH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	ref NP_015264.1

---

#### 4.6.4 NylD および NylE の遺伝子構造

##### 4.6.4.1 NylD の遺伝子構造

機能もしくは関連する反応を類推するため、NylD 周辺の遺伝子構造を確認した(Fig. 4-10)。6-アミノヘキサン酸はアミノ基転移反応を受けたのち、セミアルデヒドに変換され、次にアルデヒド脱水素酵素により酸化されると予測した。NylD<sub>1</sub> の遺伝子構造をみると、近くにアルデヒドデヒドロゲナーゼが確認され、予想した反応にこの酵素がかかわることが示唆された。また、*Arthrobacter aurescens* の GABA アミノ基転移酵素、gabT の構造と、NylD<sub>1</sub> の構造を比較すると、近隣にある遺伝子が同じ向きで同様の位置に配置していることや、それぞれが高い相同性をもっているなどの複数の類似性が確認された。このことは NylD<sub>1</sub> が KI72 の進化途中で組み換えや転移により挿入された可能性を示している。

NylD<sub>2</sub> もまた、6-アミノヘキサン酸代謝に関連する可能性のあるアルデヒドデヒドロゲナーゼを近くに持つことが確認された。6-アミノヘキサン酸はアジピン酸セミアルデヒドを経由してアジピン酸に変換されると予測したが、それ以降には脂肪酸代謝に類似した反応で分解が起こると予測を行っている。

NylD<sub>2</sub> の周辺を確認すると、CoA デヒドロゲナーゼなどの脂肪酸代謝に関連する酵素が複数確認できた。これらの酵素についても、6-アミノヘキサン酸代謝に関与している可能性が示唆された。

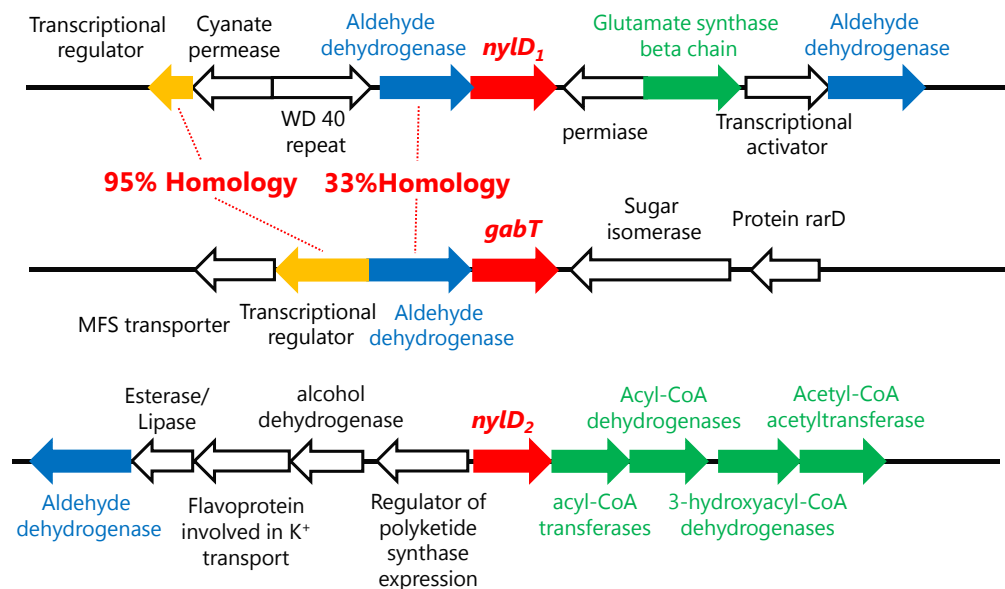


Fig. 4-10 Gene structure of NylD.

#### 4.6.4.2 NylE の遺伝子構造

ASALDH および SSALDH に分類した NylE の機能もしくは関連する反応を類推するため遺伝子構造を確認した(Fig. 4-11 A)。まず、新たに ASALDH に分類した NylE<sub>1</sub>、NylE<sub>3</sub> および NylE<sub>6</sub> の構造をみると、NylE<sub>1</sub> の近くに 6-アミノヘキサ酸代謝に関与する可能性のある脂肪酸代謝関連酵素が確認された。3 つの NylE について比較を行ったが、遺伝子構造に類似性は確認できなかった。

次に、SSALDH に分類した NylE<sub>2</sub>、NylE<sub>4</sub>、NylE<sub>5</sub> および NylE<sub>8</sub> について遺伝子構造を確認した(Fig. 4-11 B)。これらについても、ASALDH に分類した NylE 同様に NylE<sub>2</sub> および NylE<sub>8</sub> の近辺に脂肪酸代謝関連酵素が確認されたが、それぞれの全体構造については、明確な類似性は確認されなかった。構造に類似性がみられなかったことより、それぞれの遺伝子の分化がかなり進んでいることが推測された。

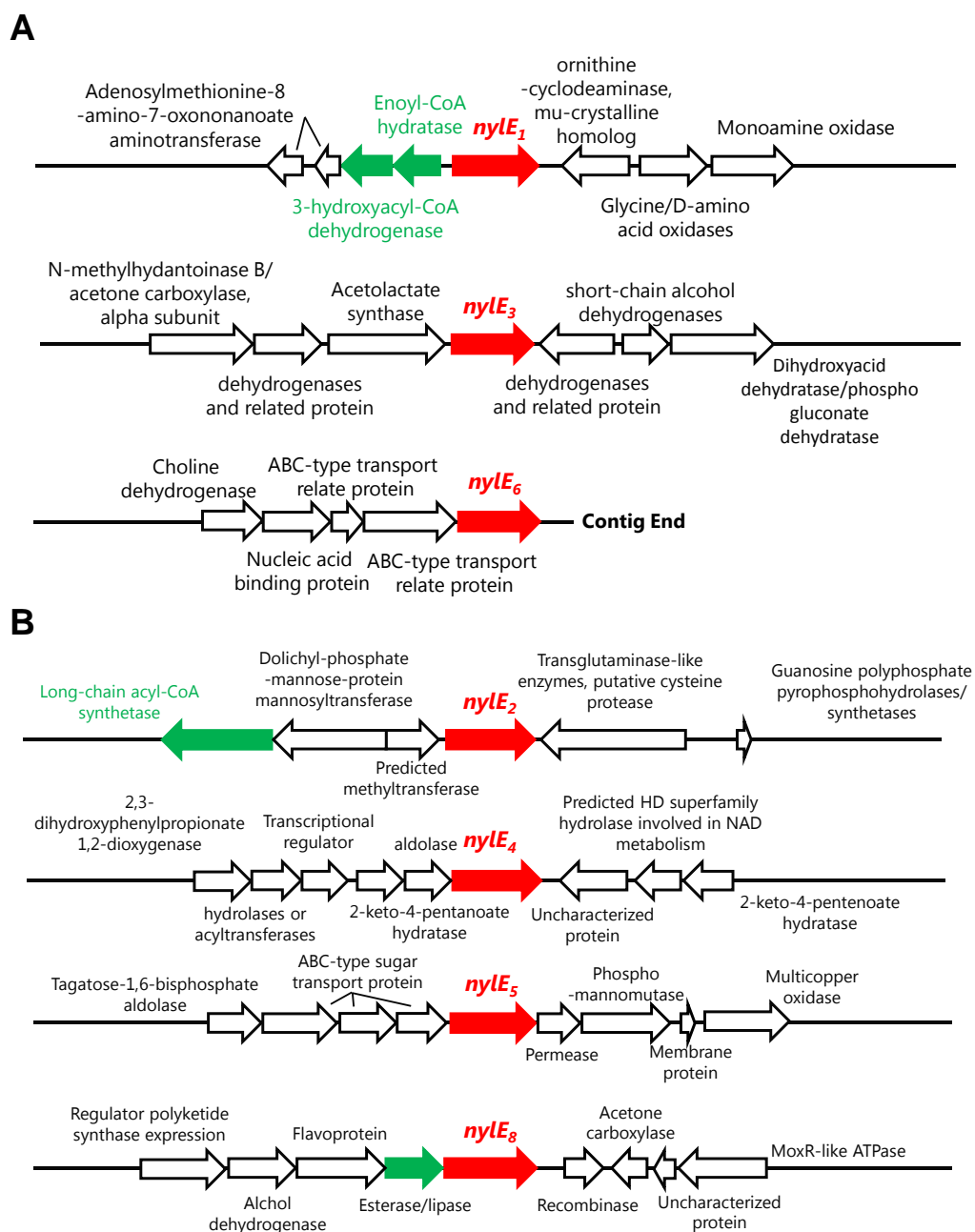


Fig. 4-11 Gene structure of NylE.  
NylE classified into ASALDH (A) and SSALDH (B)



#### 4.6.5 発現プラスミドの構築と精製

候補とした酵素の機能を確認するため、酵素の取得を試みた。KI72 株ゲノムより NylD<sub>I</sub>/NylE<sub>I</sub> 配列を PCR により増幅し、制限酵素的に断片を消化した後、同様に制限酵素的に消化した pCold ベクターに挿入することで発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドは大腸菌に形質転換し、培養により目的タンパク質を大量発現し、最終的には His-tag 融合タンパク質として精製を行った。その結果、高純度の、十分量の目的タンパク質を取得することができた(Fig. 4-12)。

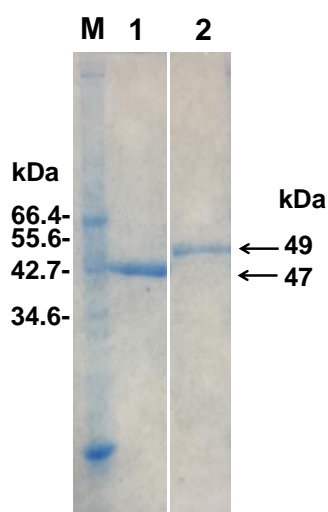


Fig. 4-12 SDS-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis.  
Slot 1, NylD<sub>I</sub>; slot 2, NylE<sub>I</sub>; slot M, molecular weight standardproteins

#### 4.6.6 活性測定

##### 4.6.6.1 NyID<sub>1</sub> アッセイ

NyID<sub>1</sub> のアミノ基転移活性を確認するため、アミノ基供与体(Ahx/GABA)とアミノ基受容体( $\alpha$ -KG)を用いて酵素反応を行った。その結果、TLC において生成物である L-グルタミン酸のスポットが確認された(Fig. 4-13)。スポットの強度は弱いものの、このことから、NyID<sub>1</sub> は Ahx および GABA を基質としてアミノ基転移活性を持つことが明らかとなった。

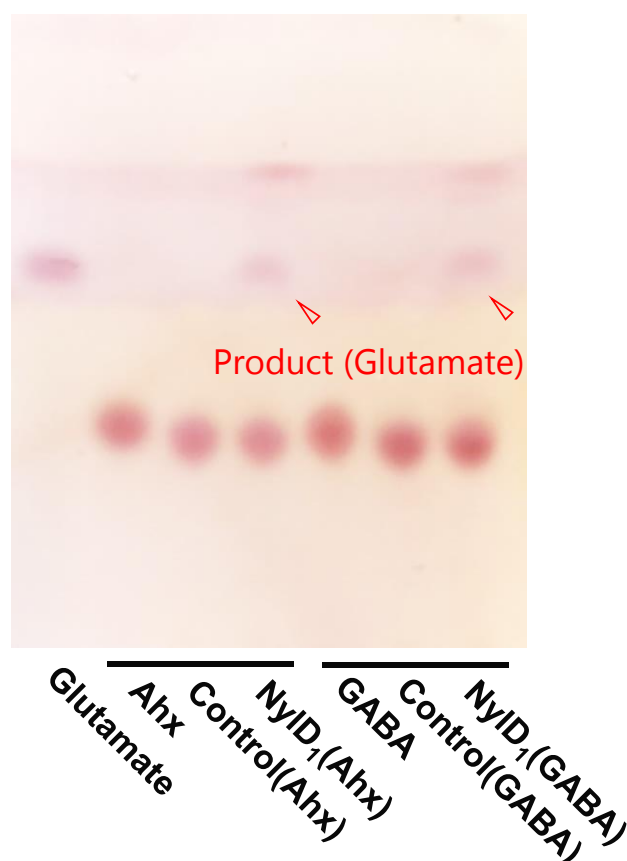


Fig. 4-13 Detection of NyID<sub>1</sub> activity by TLC.

Slot 1, reaction from Ahx without NyID<sub>1</sub>; slot 2, reaction from Ahx; slot 3, reaction from GABA without NyID<sub>1</sub>; slot 4, reaction from GABA.

##### 4.6.6.2 NyIE<sub>1</sub> アッセイ(酸化反応)

NyIE<sub>1</sub> の酸化活性を確認するため、化学合成した ASA および SSA を基質として、NADP<sup>+</sup>を補酵素として酵素反応を行った(Fig. 4-14)。NADPH の 340nm(A<sub>340</sub>)吸収をモニターすることで酵素反応の初速度を評価した。反応開始後には、ASA/SSA 双方で NADPH の生成が観察された。比活性を求めたところ、ASA の比活性(18  $\mu$  mol/min (U)/ mg-protein)は SSA の比活性(0.034 U/ mg-protein)の約 500 倍であった。この結果は、NyIE<sub>1</sub> は GABA/Succinate 代謝

と比較し、Ahx/Adipate 代謝にかかわる基質で高い活性を示すことを明らかにしている。

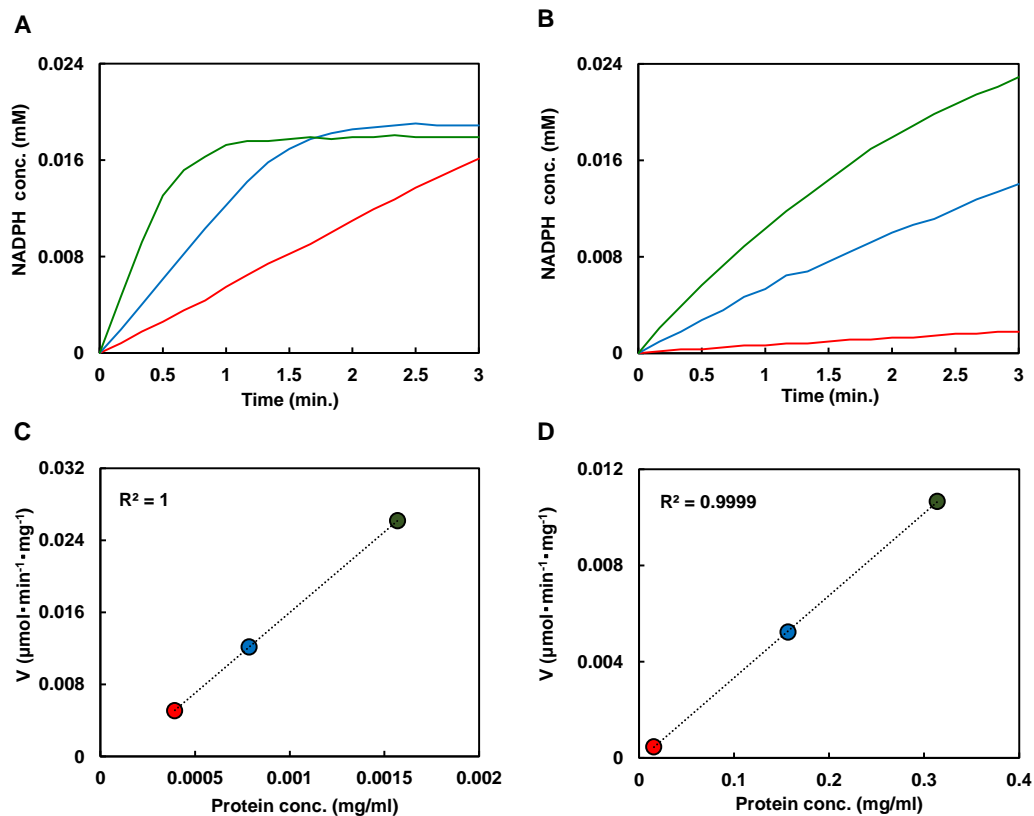


Fig. 4-14 Time course of NylE<sub>1</sub> oxidative reaction.

**A** For the assay of the oxidative activity, NylE<sub>1</sub> (0.0004, 0.008, and 0.0016 mg/ml) was incubated at 30 °C with 0.5 mM ASA and 0.1 mM NADP<sup>+</sup> in 100 mM PPB (pH 7.8). The progress of the reactions was monitored by the increase in the  $A_{340}$ . **B** Enzyme reactions were similarly performed using 0.5 mM SSA and NylE<sub>1</sub> (0.016, 0.16, and 0.31 mg/ml). **C, d** Initial reaction rates for ASA and SSA.

#### 4.6.6.3 NylE<sub>1</sub> アッセイ(還元反応)

NylE<sub>1</sub> の還元活性を確認するため、アジピン酸を基質として、また NADPH を補酵素として酵素反応を行った(Fig. 4-15)。NADPH の 340nm(A<sub>340</sub>)吸収をモニターすることで酵素反応の進行を確認した。この反応では酸化反応で使用した NylE<sub>1</sub> 量の 31 倍を用いたが、A<sub>340</sub> の変動は確認できなかった。このことから、NylE<sub>1</sub> は酸化反応に特異的であることが明らかとなった。

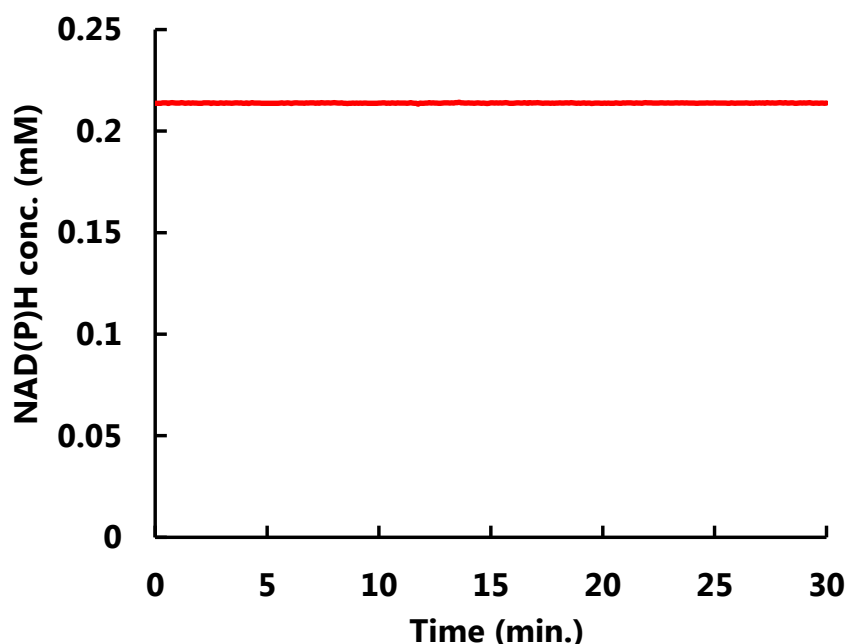


Fig. 4-15 Time course of NylE<sub>1</sub> reductive reaction.

#### 4.6.6.4 NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系の構築

NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系に必要な成分を確認するため、共役系に必要と考えられる成分をすべて入れたものと各成分を除外したもので比活性を比較した。NylD<sub>1</sub>, NylE<sub>1</sub>, Ahx,  $\alpha$ -KG および NADP<sup>+</sup>を除外した反応系では、比活性は大幅にバックグラウンドのレベルまで減少した(全成分を添加した反応系のおよそ 1.2~3.8%(Table 4-17, Fig. 4-16))。しかし、PLP を除外した反応系では 26%の活性が残存していた。くわえて、他の生物のセミアルデヒドデヒドロゲナーゼでは活性に影響を与えることが知られている DTT および EDTA は、検出可能な影響を与えないことが明らかとなった。

また、すべての成分を添加した系で反応曲線が変化しなくなるまで反応を行ったところ、この共役系により理論値の約 90%の Ahx がアジピン酸に変換されていることが明らかとなった(Fig. 4-17)。

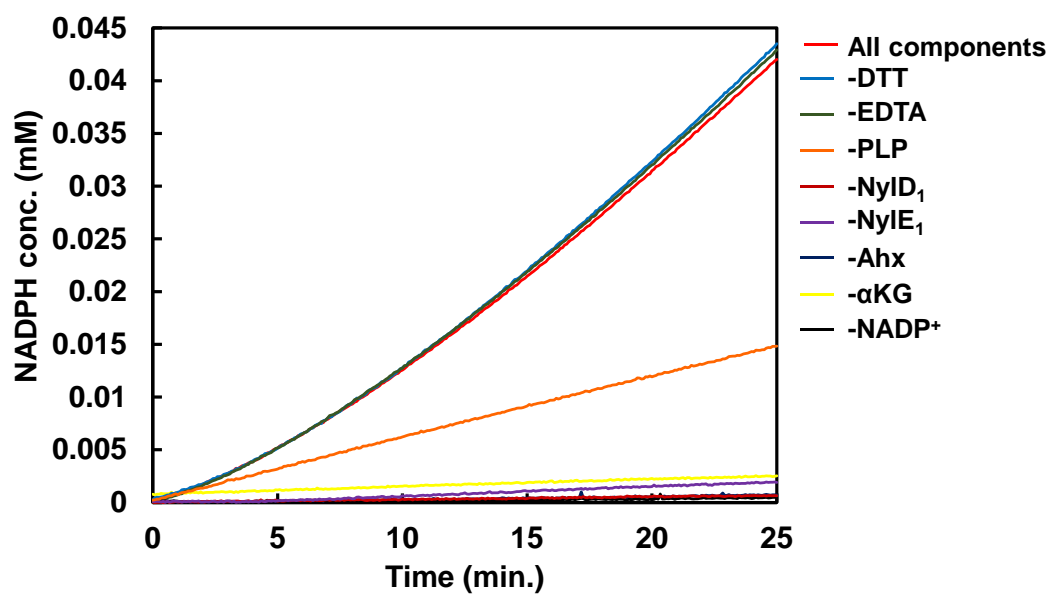


Fig. 4-16 Factors responsible for the coupled system.

Table 4-20 Factors responsible for the catalytic activity

Composition	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Relative activity (%)
All components	$4.2 \times 10^{-2}$	100
— DTT	$4.4 \times 10^{-2}$	105
— EDTA	$4.3 \times 10^{-2}$	102
— PLP	$1.1 \times 10^{-2}$	26
— NylD <sub>1</sub>	$5.0 \times 10^{-4}$	1.2
— NylE <sub>1</sub>	$1.6 \times 10^{-3}$	3.8
— Ahx	$7.1 \times 10^{-4}$	1.7
— $\alpha\text{KG}$	$1.1 \times 10^{-3}$	2.6
— NADP <sup>+</sup>	$4.5 \times 10^{-4}$	1.1

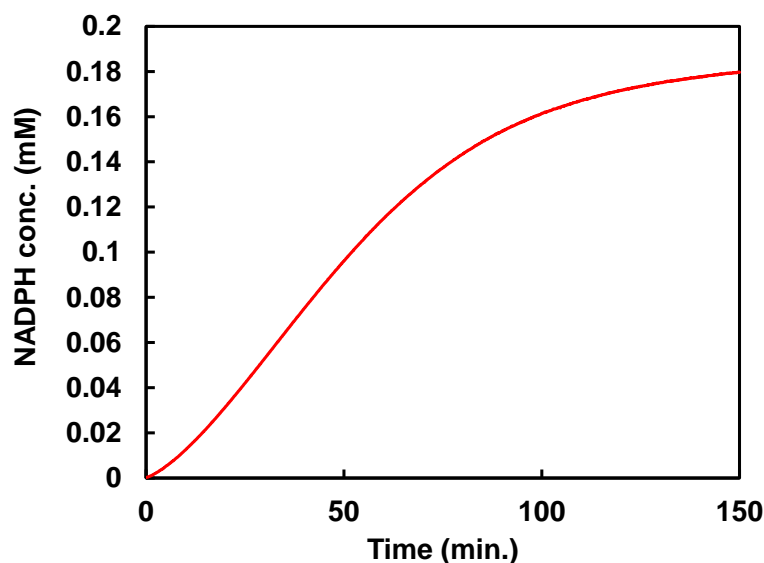


Fig. 4-17 Ahx conversion by the coupled system.

#### 4.6.6.5 共役系による NylD<sub>1</sub> のアッセイ

NylD<sub>1</sub> の Ahx 活性を測定するため、構築した NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系を用いた定量的な測定系の構築を試みた。上記の結果より、NylD<sub>1</sub> は Ahx もしくは GABA を基質、 $\alpha$ -KG をアミノ基受容体として、アミノ基転移活性を持つことが確認された。共役系を用いた測定系では NylE<sub>1</sub> が NylD<sub>1</sub> の反応速度を大きく上回っている必要がある。すなわち、Ahx は ASA の蓄積を経ずに、直ちにアジピン酸へと変換される必要がある。これにより、A<sub>340</sub> を測定することで NylD<sub>1</sub> の連続した活性を測定することが可能になる。NylE<sub>1</sub> は ASA を基質とした反応特異性が高いことを示した先の実験結果より、NylE<sub>1</sub> は NylD<sub>1</sub> の Ahx 変換活性を測定できる共役系への適用に適していると判断した。第一に NylE<sub>1</sub> の濃度を変化させても、反応曲線が変化しない反応系(過剰量の NylE<sub>1</sub> が存在)を構築した。ここでは NylE<sub>1</sub> の濃度を 2 倍に変化させても反応速度に変化は見られなかった(Fig. 4-18 A curve 1 and 2)。また、NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub>=0.05/0.05 mg/ml とした反応(Fig. 4-18 A curve 2)における NylE<sub>1</sub> の ASA 活性は、先の NylE<sub>1</sub> アッセイ実験の結果(18 U/mg)より 0.9 U/mg と算出できる。しかし、NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系を用い NylD<sub>1</sub> の活性を求めると、0.066 U/mg であった。上記より、構築した測定系では過剰量のセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(NylE)存在下でアミノ基転移反応が進行していることを確認した。

また、アミノ基転移反応におけるアミノ基受容体の選択性を確認するため、 $\alpha$ -KG に加えて 2 種類の 2 オキソ酸(ピルビン酸およびグリオキシル酸)をアミノ基受容体として NylD<sub>1</sub> の活性を評価した(Fig. 4-18 B and C)。その結果、

NylD<sub>1</sub>は $\alpha$ -KGとグリオキシル酸ではほぼ同程度の活性を示したものの、ピルビン酸では $\alpha$ -KGと比較して活性が30% (Assay 1)、70% (Assay 2)と低くなった(Table 4-21)。TLCを用いた評価では、Ahxと2-オキソ酸を基質としたNylD<sub>1</sub>の反応液より、グルタミン酸、アラニンおよびグリシンのスポットが得られた。アミノ基受容体として $\alpha$ -KGおよびグリオキシル酸を用いた反応では、反応後60分後におよそ50%の変換が確認され、180分後にはほぼすべてのAhxがグルタミン酸およびグリシンに変換された(Fig. 4-19 A and B)。コントロールとして用いたNylE<sub>1</sub>を除外した反応系(アミノ基受容体としてグリオキシル酸を使用)では、反応後180分後におよそ50%の変換が確認された(Fig. 4-19 D)。このことより、NylD<sub>1</sub>は3種類の2-オキソ酸を利用できるが、グリオキシル酸/ $\alpha$ -KG/ピルビン酸の順に選択性を持つことが明らかとなった。また、の逆反応を起因とするAhxのアジピン酸への変換は、NylE<sub>1</sub>を共役することにより促進されることが明らかとなった。

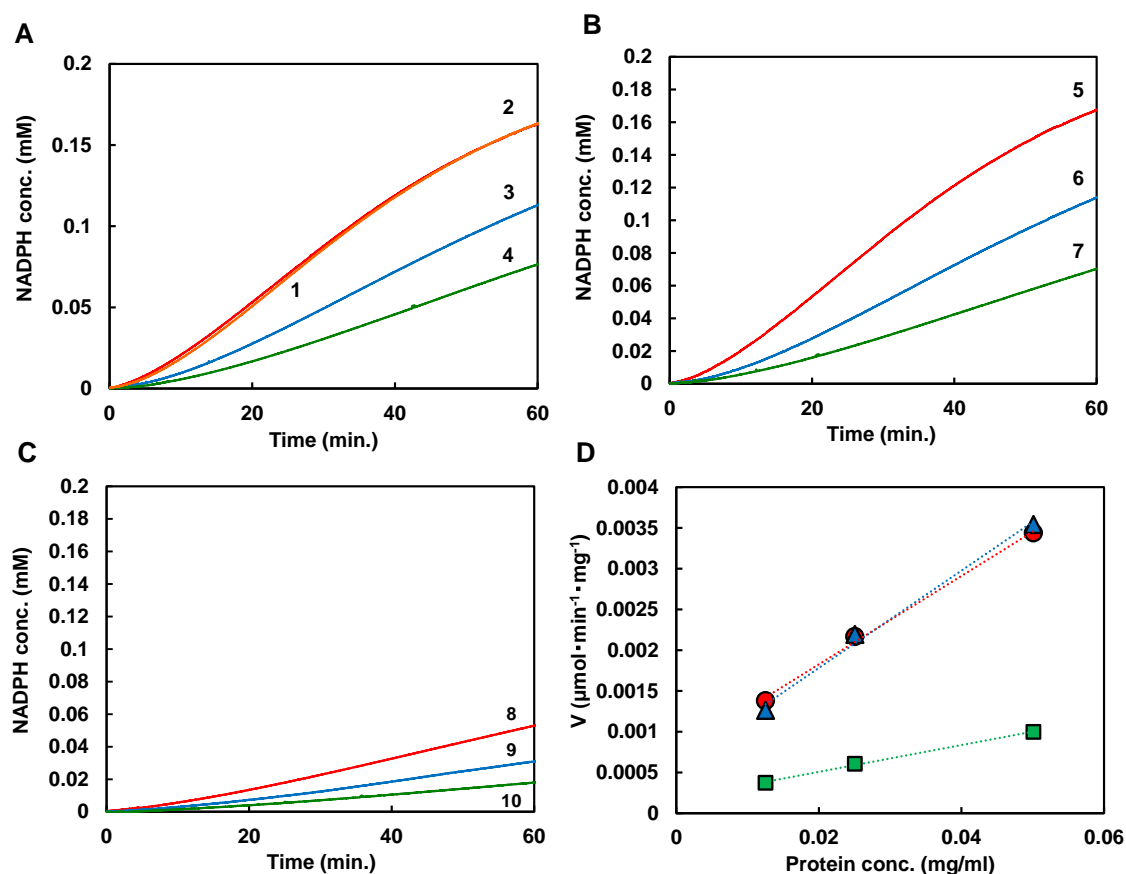
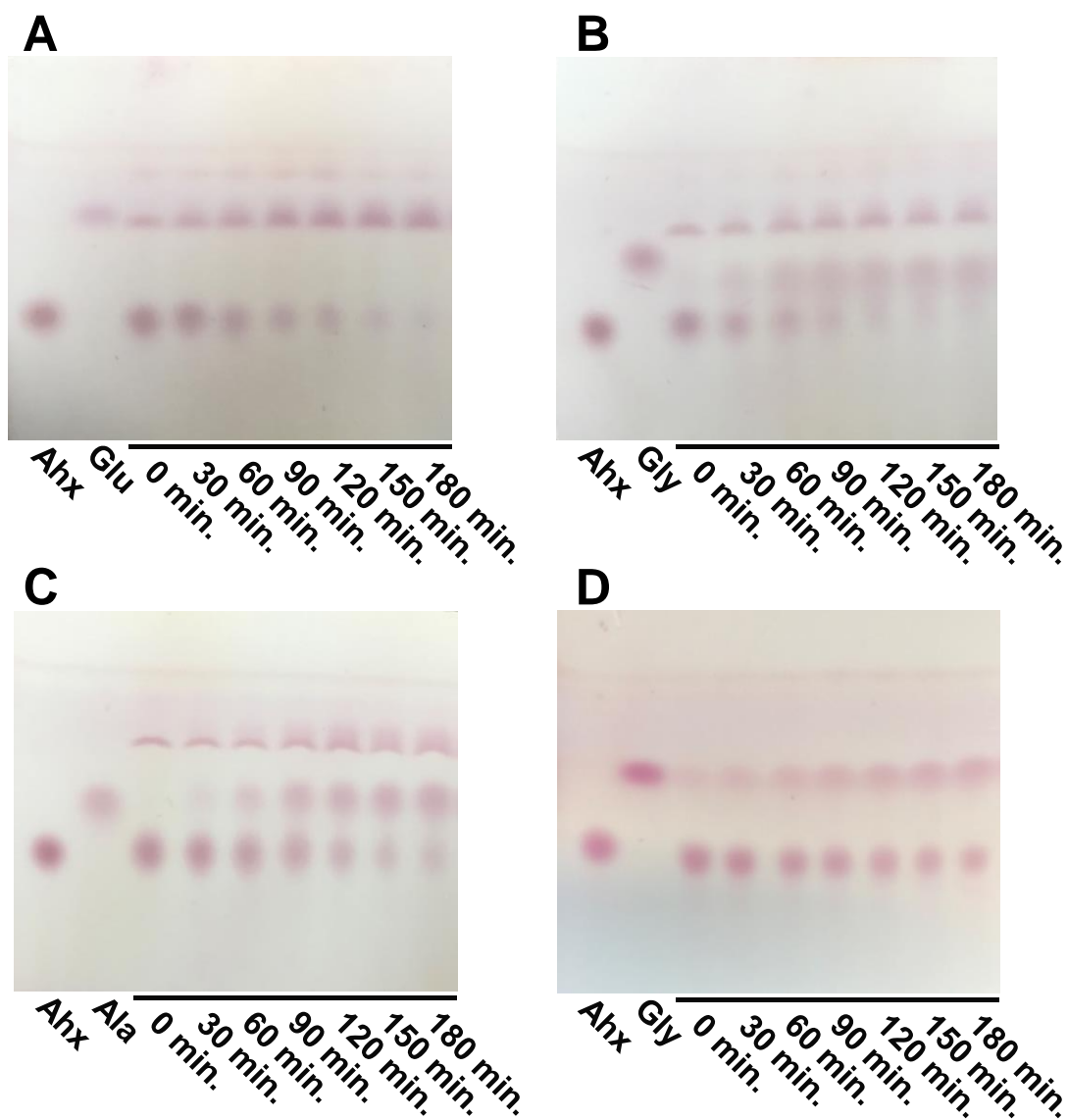


Fig. 4-18 Time course of NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> coupled reaction at different enzyme concentration.

The coupled reaction was performed by changing the ratio of NylD<sub>1</sub> and NylE<sub>1</sub> activity in the standard assay conditions. Enzyme activity was assayed using  $\alpha$ -KG (A), glyoxylate (B), or

pyruvate (**C**) as amino acceptor. NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> = 0.05/0.1 mg/ml (1); 0.05/0.05 mg/ml (2); 0.025/0.05 mg/ml (3); 0.0125/0.05 mg/ml (4); 0/0.05 mg/ml (5). **D** Aminotransferase activity was calculated by subtracting the background level ([NylD<sub>1</sub>] = 0, line 5) from the reaction rate in the complete system. The activity was plotted for the protein concentrations of NylD<sub>1</sub>.  $\alpha$ -KG (*red circles*); glyoxylate (*blue triangles*); pyruvate (*green squares*).





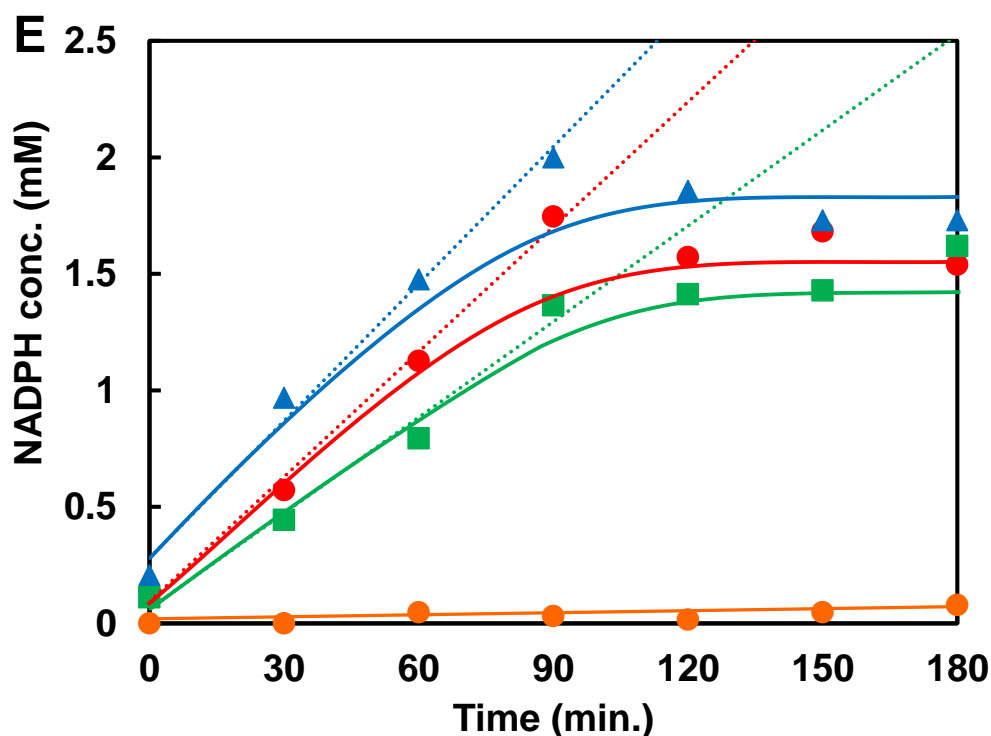


Fig. 4-19 Time course of the NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> coupled reaction.

Purified NylD<sub>1</sub> (0.1 mg/ml) and NylE<sub>1</sub> (0.1 mg/ml) were incubated at 30 °C with 2 mM Ahx (amino donor) and 2.5 mM of the amino acceptor [ $\alpha$ -KG (**A**), glyoxylate (**B**), and pyruvate (**C**)], 0.1 mM PLP, 2.5 mM NADP<sup>+</sup>, 100 mM KPB (pH 7.8). The reaction mixtures were sampled at 30-min intervals (up to 180 min), and the reaction products were analyzed by TLC. As a control experiment, transamination from Ahx to glyoxylate was investigated in the absence of NylE<sub>1</sub> and NADP<sup>+</sup> (**D**). Authentic Ahx, GABA, L-Glu, Gly, and L-Ala were spotted on TLC plates. **E** To quantify the rate of NADPH formation, the aliquots were suitably diluted, and the A<sub>340</sub> was measured.  $\alpha$ -KG (red circles), glyoxylate (blue triangles), pyruvate (green squares). Time course of the reaction using glyoxylate in the absence of NylE<sub>1</sub> and NADP<sup>+</sup> was shown as orange circles. The initial reaction rate was estimated from the dashed line for each substrate (Table 4-21).

Table 4-21

6-Aminohexanoate aminotransferase activity by NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> coupled system. Specificity of amino acceptor

Amino acceptor	Specific activity (μmol/min/mg)	
	Assay 1	Assay 2
α-KG	0.066	0.16
Glyoxyrate	0.068	0.21
Pyruvate	0.019	0.11

#### 4.6.7 最少培地における *Arthrobacter* sp.KI72 とその変異体の増殖実験 2

*Arthrobacter* sp.KI72 のアジピン酸以降の代謝経路について知見を得るため、*Arthrobacter* sp.KI72 とその変異株のアジピン酸およびコハク酸を唯一の炭素/窒最少培地を調製し、増殖を確認した。各変異株間においてコハク酸最少培地では増殖の程度はさほど変わらなかったのに対し(Fig. 4-20 B)、アジピン酸最少培地では明瞭な差が確認された(Fig. 4-20 A)。アジピン酸最少培地では、KI723/ KI723T1 の増殖が最も良好で、その他の変異株においては増殖の程度が低かった。変異株はそれぞれが保有するプラスミド pOAD1 に大きな違いがある。アジピン酸最少培地で増殖に差がみられたのは、Ahx のアジピン酸以降の代謝にかかわる酵素が pOAD1 上にコードされていることを示唆しており、KI723 おおおよび KI723T1 が保有する pOAD11 上にアジピン酸以降の代謝に働く遺伝子がコードされていると考えられる。

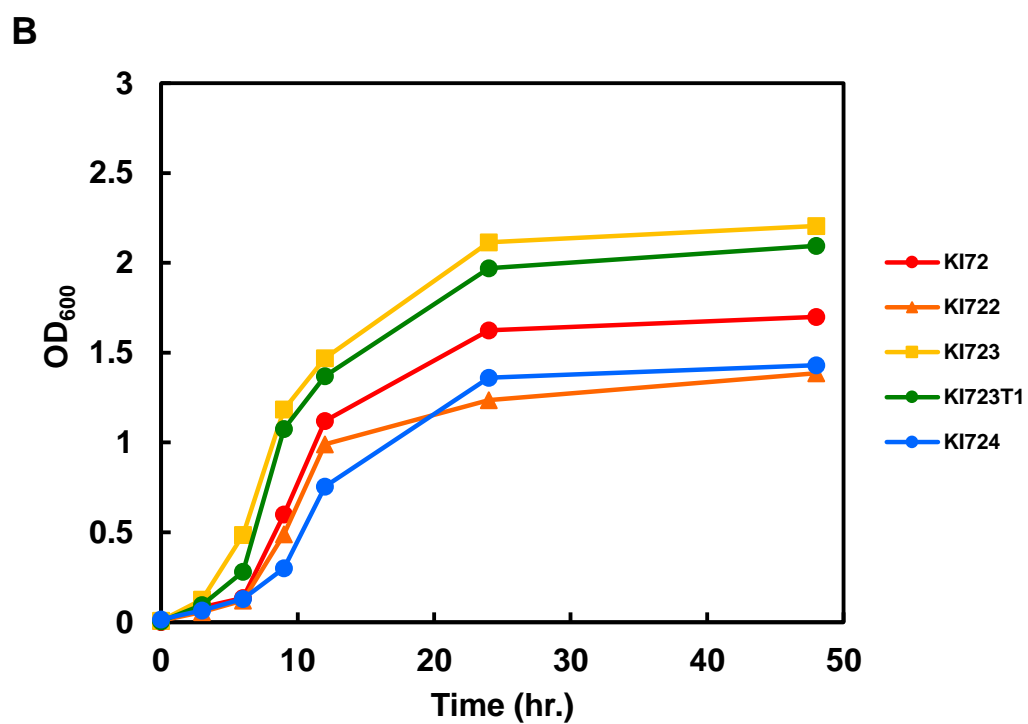
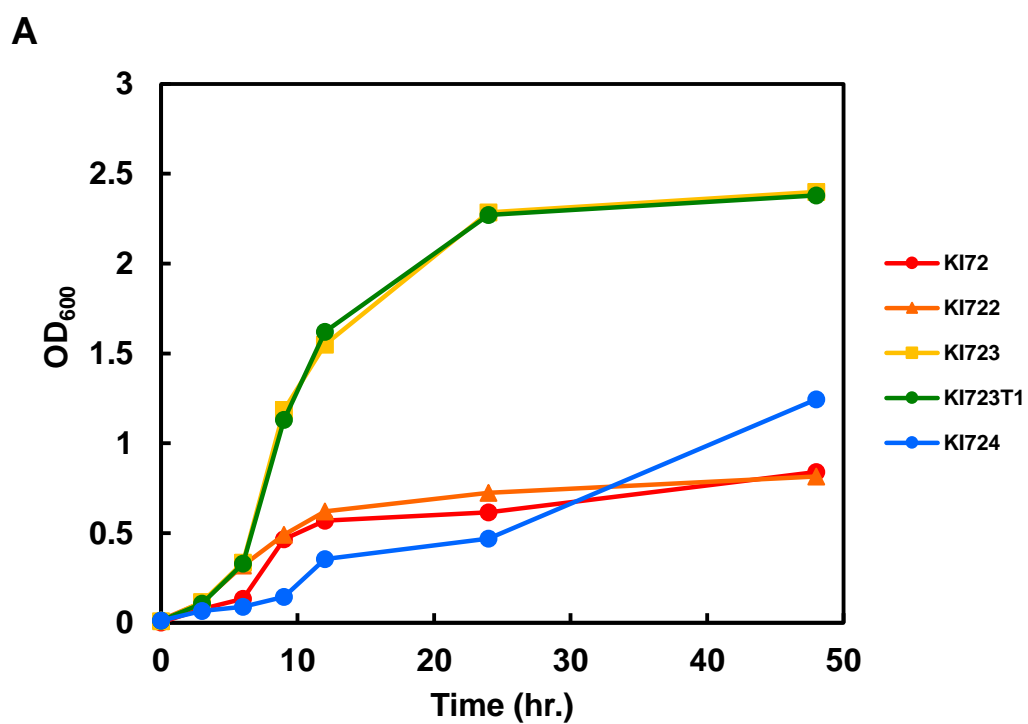


Fig. 4-20 Growth curve of strain KI72 and mutants.  
**A** Growth curve in Adipate, **B** Succinate.

#### 4.7 結論

本章では、KI72 株は 6-ナイロンモノマーである Ahx を Ahx アミノトランスフェラーゼ(NylD<sub>1</sub>)および ASA デヒドロゲナーゼ(NylE<sub>1</sub>)の連続した反応によりアジピン酸へ変換している代謝経路を同定した。われわれは、NylD<sub>1</sub> が Ahx を ASA へ変換し、その反応にはアミノ基受容体として  $\alpha$ -KG/ピルビン酸/グリオキシル酸を利用し、それぞれグルタミン酸/アラニン/グリシンへ変換することを確認した。また、このアミノ基転移反応には補酵素として PLP が要求される。くわえてアミノ基転移反応に続く反応として、NylE<sub>1</sub> が NADP<sup>+</sup>を補酵素として酸化反応により ASA をアジピン酸へ変換することを確認した。系統学的解析により、NylD<sub>1</sub> は PLP 依存性アミノトランスフェラーゼサブグループ III に、NylE<sub>1</sub> はアルデヒドデヒドロゲナーゼの新しいグループに分類されることを確認した。また、NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系を構築し、NylD<sub>1</sub> の Ahx 変換活性測定系に応用した。構築した共役系における Ahx⇒アジピン酸変換効率は理論値の 90%以上であった。

## 参考文献

- 1) Alexander FW, Sandmeier E, Mehta PK, Christen P (1994) Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Eur J Biochem* 219:953–960
- 2) Bartsch K, von Johnn-Marteville A, Schulz A (1990) Molecular analysis of two genes of the *Escherichia coli* *gab* cluster: nucleotide sequence of the glutamate:succinic semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). *J Bacteriol* 172:7035-7042
- 3) Bruce H, Nguyen Tuan A, Mangas Sanchez J, Leese C, Hopwood J, Hyde R, Hart S, Turkenburg JP, Grogan G (2012) Structures of a  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) transaminase from the *s*-triazine-degrading organism *Arthrobacter aurescens* TC1 in complex with PLP and with its external aldimine PLP–GABA adduct. *Acta Crystallogr Sect F* 68: 1175-1180
- 4) Chen J, Li Z, Jin L, Ni P, Liu G, He H, Zhang J, Dong J, Ruan R (2010) Catalytic hydrothermal depolymerization of nylon 6. *J Mater Cycles Waste Manag* 12: 321–325
- 5) Chen Y, Nielsen J (2013) Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr Opin Biotechnol* 24:965-972. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.008>
- 6) de Carvalho LP, Ling Y, Shen C, Warren JD, Rhee KY (2011) On the chemical mechanism of succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD1) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 509:90-99. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.023>
- 7) Draths KM, Frost JW (1994). Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc* 116:399–400 <https://doi.org/10.1021/ja00080a057>
- 8) Eliot AC, Kirsch JF (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73, 383-415
- 9) Hwang, B-Y., Cho, BK, Yun H, Koteswar K, Kim, B-G (2005) Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *J Mol Catal B Enzym* 37: 47–55
- 10) Iwaki H, Hasegawa Y, Teraoka M, Tokuyama T, Bergeron H, Lau PC (1999) Identification of a transcriptional activator (ChnR) and a 6-oxohexanoate dehydrogenase (ChnE) in the cyclohexanol catabolic pathway in *Acinetobacter* sp. strain NCIMB 9871 and localization of the genes that encode them. *Appl Environ Microbiol* 65:5158-5162
- 11) Iwaya T, Sasaki M, Goto M (2006) Kinetic analysis for hydrothermal depolymerization of nylon 6. *Polym Degrad Stabil* 91:1989–1995
- 12) Kato K, Ohtsuki K, Koda Y, Maekawa T, Yomo T, Negoro S, Urabe I (1995) A plasmid encoding enzymes for nylon oligomer degradation: nucleotide sequence and analysis of pOAD2. *Microbiol* 141:2585-2590. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2585>

- 13) Kockelkorn D, Fuchs G (2009) Malonic semialdehyde reductase, succinic semialdehyde reductase, and succinyl-coenzyme A reductase from *Metallosphaera sedula*: enzymes of the autotrophic 3-hydroxypropionate / 4-hydroxybutyrate cycle in *Sulfolobales*. J Bacteriol 191: 6352–6362
- 14) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947-2948
- 15) Liu W, Peterson PE, Carter RJ, Zhou X, Langston JA, Fisher AJ, Toney MD (2004) [Crystal structures of unbound and aminooxyacetate-bound *Escherichia coli* gamma-aminobutyrate aminotransferase. Biochemistry 43:10896-10905
- 16) Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABA: A receptor channels. Annu Rev Neurosci 17: 569–602
- 17) Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. Eur J Biochem 214:549-561
- 18) McIntyre, JE. (2005). Synthetic fibres: nylon, polyester, acrylic, polyolefin (1st ed.). Cambridge: Woodhead. p. 10. ISBN 9780849325922.
- 19) Nagai K, Iida K, Shimizu K, Kinugasa R, Izumi M, Kato D, Takeo M, Mochiji K, Negoro S (2014) Enzymatic hydrolysis of nylons: quantification of the reaction rate of nylon hydrolase for thin-layered nylons. Appl Microbiol Biotechnol 98:8751-8761. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5885-2>
- 20) Negoro S (2000) Biodegradation of nylon oligomers. Appl Microbiol Biotechnol 54:461-466. <https://doi.org/10.1007/s002530000434>
- 21) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Mizuno N, Wakitani Y, Tsurukame J, Matsumoto K, Kawamoto I, Takeo M, Higuchi Y (2005) X-ray crystallographic analysis of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase: molecular basis for the birth of a nylon oligomer degrading enzyme. J Biol Chem 280:39644-39652 <https://doi.org/10.1074/jbc.M505946200>
- 22) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y (2007) Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex: catalytic mechanism of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase. J Mol Biol 370:142-156. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.043>
- 23) Negoro S, Shibata N, Tanaka Y, Yasuhira K, Shibata H, Hashimoto H, Lee Y-H, Oshima S, Santa R, Oshima S, Mochiji K, Goto Y, Ikegami T, Nagai K, Kato D, Takeo M, Higuchi Y (2012) Three-dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis. J Biol Chem 287:5079-5090 <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.321992>

- 24) Okada H, Negoro S, Kimura H, Nakamura S (1983) Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers. *Nature* 306:203-206. <https://doi.org/10.1038/306203a0>
- 25) Percudani R, Peracchi A (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate- dependent enzymes. *EMBO Rep* 4: 850-854
- 26) Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* 8:137–146
- 27) Phillips RS (2015) Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1854: 1167-1174. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.028.
- 28) Polen T, Spelberg M, Bott M (2013) Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. *J Biotechnol* 167:75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.008>
- 29) Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 30) Sanchez M, Fernández J, Martin M, Gibello A, Garrido-Pertierra A (1989) Purification and properties of two succinic semialdehyde dehydrogenases from *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta* 990:225-231
- 31) Sattler JH, Fuchs M, Mutti FG, Grischek B, Engel P, Pfeffer J, Woodley JM, Kroutil W (2014) Introducing an in situ capping strategy in systems biocatalysis to access 6-aminohexanoic acid. *Angew Chem Int Ed* 53: 14153-14157. <http://doi:10.1002/anie.201409227>
- 32) Schioli D, Peracchi A (2015) A subfamily of PLP-dependent enzymes specialized in handling terminal amines. *Biochim Biophys Acta* 1854: 1200-1211. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.02.023.
- 33) Schneider BL, Ruback S, Kiupakis AK, Kasbarian H, Pybus C, Reitzer L (2002) The *Escherichia coli* *gabDTPC* operon: specific  $\gamma$ -aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. *J Bacteriol* 184:6976-6986. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6976-6986.2002>
- 34) Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4: 446-452
- 35) Sophos NA, Vasiliou V (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol Interact* 143-144:5-22
- 36) Steffen-Munsberg F, Vickers C, Kohls H, Land H, Mallin H, Nobili A, Skalden L, van den Bergh T, Joosten HJ, Berglund P, Höhne M, Bornscheuer UT (2015) Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnol Adv* 33:566-604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.012

- 37) Storici P, De Biase D, Bossa F, Bruno S, Mozzarelli A, Peneff C, Silverman RB, Schirmer T (2004) Structures of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with  $\gamma$ -ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin. *J Biol Chem* 279: 363-373
- 38) Strong LC., Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) *Arthrobacter aureus* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5973-5980
- 39) Takehara I, Kato DI, Takeo M, Negoro S (2017) Draft genome sequence of the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain KI72. *Genome Announc* 5: pii: e00217-17. doi: 10.1128/genomeA.00217-17.
- 40) Taniyama K, Itoh H, Takuwa A, Sasaki Y, Yajima S, Toyofuku M, Nomura N, Takaya N.(2012) Group X aldehyde dehydrogenases of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 degrade hydrazones. *J Bacteriol* 194:1447-1456.
- 41) Travis, AS (1998). Determinants in the evolution of the European chemical industry:1900-1939: new technologies, political frameworks, markets and companies. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. p. 115.
- 42) Turk SC, Kloosterman WP, Ninaber DK, Kolen KP, Knutova J, Suij E, Schürmann M, Raemakers-Franken PC, Müller M, de Wildeman SM, Raamsdonk LM, van der Pol R, Wu L, Temudo MF, van der Hoeven RA, Akeroyd M, van der Stoep RE, Noorman HJ, Bovenberg RA, Trefzer AC (2016) Metabolic engineering toward sustainable production of nylon-6. *ACS Synth Biol* 5: 65-73 .doi:10.1021/acssynbio.5b00129
- 43) Yasuhira K, Tanaka Y, Shibata H, Kawashima Y, Ohara A, Kato D, Takeo M, Negoro S. (2007a) 6-Aminohexanoate oligomer hydrolases from the alkalophilic bacteria *Agromyces* sp. strain KY5R and *Kocuria* sp. strain KY2. *Appl Environ Microbiol* 73:7099-7102. doi:10.1128/AEM.00777-07
- 44) Yasuhira K, Uedo Y, Takeo M, Kato D, Negoro S (2007b) Genetic organization of nylon-oligomer-degrading enzymes from an alkalophilic bacterium *Agromyces* sp. KY5R. *J Biosci Bioeng* 104:521-524. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.521>
- 45) Yasuhira K, Shibata N, Mongami G, Uedo Y, Atsumi Y, Kawashima Y, Hibino A, Tanaka Y, Lee Y-H, Kato D, Takeo M, Higuchi Y, Negoro S (2010) X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation. *J Biol Chem* 285:1239-1248 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041285>



## 第5章

### NylD/NylE アイソザイムの生化学的特徴づけ

#### 5.1 諸言

前章では、KI72 株は 6-ナイロンモノマーである Ahx を Ahx アミノトランスフェラーゼ(NylD<sub>1</sub>)および ASA デヒドロゲナーゼ(NylE<sub>1</sub>)の連続した反応によりアジピン酸へ変換している代謝経路を同定した。また、KI72 ゲノム配列中で GABA アミノトランスフェラーゼおよびアジピン酸/コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼの配列との相同性を確認することにより NylD/NylE 候補配列を複数抽出した。系統学的な解析により、*Arthrobacter aureus* の GABA アミノトランスフェラーゼ(Ara-GABT)と最も相同性の高い NylD<sub>1</sub> と、アジピン酸セミアルデヒド(6-oxohexanoate)デヒドロゲナーゼ(Rho-ChnE; *chnE* gene from *Rhodococcus*)と最も相同性の高い NylE<sub>1</sub> を Ahx 代謝の主要酵素であると仮定して実験を進めてきたが、それらには複数のアイソザイムが存在している。本章では、NylD/NylE アイソザイムの生化学的特徴づけを行い、それらが KI72 株の Ahx 代謝にどのように関連しているかを確認した。NylD については NylD<sub>1</sub> と NylD<sub>2</sub>、NylD については第 4 章の系統学的分類で ASALDH および SSALDH に分類した NylE<sub>1</sub>, NylD<sub>3</sub>, NylD<sub>6</sub>(ASALDH), NylE<sub>2</sub>, NylE<sub>4</sub>, NylE<sub>5</sub> および NylE<sub>8</sub> (ASALDH)をアイソザイムとして研究に用いた。

#### 5.2 実験材料

##### 5.2.1 使用菌株、プラスミドおよび酵素

第 4 章に準じた。

#### 5.3 使用機器

第 4 章に準じた。

#### 5.4 使用培地

第 4 章に準じた。

#### 5.5 実験方法

##### 5.5.1 発現プラスミドの構築と精製

##### 5.5.1.1 発現プラスミドの構築

4.5.5.1 の方法に準じた。使用したプライマーは Table 5-1 のとおりである。

Table 5-1 Primers use in this study.

Primer name	5'→3' sequence (restriction enzyme) <sup>a</sup>	Purpose
NylD2-F	ATACAT <b>ATG</b> ACCGCAACTGCGAAC ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylD2-R	ATA <b>CTG</b> CAGTCATGAAAGCACCGAGC ( <i>PstI</i> )	of nylD <sub>2</sub>
NylE2-F	ATACAT <b>ATG</b> ACTGTCACGGTTGAACG ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE2-R	ATAT <b>CTA</b> GACTAGTCGGCGTACGGATC ( <i>XbaI</i> )	of nylE <sub>2</sub>
NylE3-F	ATACAT <b>ATG</b> AGCTCATTTGCCGTTATTG ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE3-R	ATAT <b>CTA</b> GACTACTTCGCGAAGCGGAAC ( <i>XbaI</i> )	of nylE <sub>3</sub>
NylE4-F	ATACAT <b>ATG</b> ACTGCTTCAACCGCTTTG ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE4-R	ATAT <b>CTA</b> GATTAGTTGGCGTAGGGGTC ( <i>XbaI</i> )	of nylE <sub>4</sub>
NylE5-F	TTATATCAT <b>ATG</b> AACCTGAAATCAGCACAC ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE5-R	TTATAT <b>CTA</b> GACTAGGCCCTCCACGCCAC ( <i>XbaI</i> )	of nylE <sub>5</sub>
NylE6-F	TTAATACAT <b>ATG</b> GCAATCGCGACCATC ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE6-R	ATTATAGAA <b>TTCT</b> CAGGCGGTCCAGACCG ( <i>EcoRI</i> )	of nylE <sub>6</sub>
NylE8-F	ATTTAACAT <b>ATG</b> GTGATAGCCGTCAATTTC ( <i>NdeI</i> )	Amplification
NylE8-R	ATTATAGAA <b>TTCT</b> CAACTGACGGTAAAGGGATTG ( <i>EcoRI</i> )	of nylE <sub>8</sub>

<sup>a</sup> Restriction sites are in bold, start codons are in bold italics and restriction enzymes recognizing indicated restriction sites are indicated in parentheses.

#### 5.5.1.2 酵素精製

4.5.5.2 の方法に従った。

#### 5.5.2 活性測定

##### 5.5.2.1 NylE アイソザイムのアッセイ(酸化反応)

NylE<sub>1</sub> の酸化活性を定量的に確認するため、Table 5-2 のとおり反応液を調製し、30°Cで反応させた。また、NAD<sup>+</sup>もしくは NADP<sup>+</sup>を補酵素として反応を行った。反応は NylE<sub>1</sub> の添加で開始し、反応の進行は NAD(P)H の 340nm(A340) (NADH,  $\epsilon = 6,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; NADPH,  $\epsilon = 6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )吸収をモニターすることで確認した。比活性は NylE<sub>1</sub> の濃度を変化させ、異なる酵素濃度の初速度をプロットすることで得た。合成基質(ASA/SSA)は不可逆酵素であることを確認している NylE<sub>1</sub>(もしくは NylE<sub>2</sub>)により定量し、濃度の調整を行った。

Table 5-2 Reaction mixture of NylE isozyme (oxidative reaction)

Composition	Final concentration
Synthetic semialdehyde (ASA/SSA)	0.02 mM
NAD(P) <sup>+</sup>	1 mM
NylE <sub>1</sub>	Quantum vis
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

## 5.5.2.2 NylE アイソザイムのアッセイ(還元反応)

4.5.6.3 の方法に準じた。

## 5.5.2.3 NylD アイソザイムのアッセイ

NylD アイソザイムの基質を Ahx および GABA とした活性を測定するため、Table のとおり反応を行った。Ahx 活性の測定は 4 章で構築した測定系(Table 5-3)を用い、GABA 活性の測定は SSA 特異性が高い NylE<sub>2</sub> を共役させて行った(Table 5-4)。反応は 30°Cで行い、NylD の濃度を変化させ異なる酵素濃度の初速度をプロットすることで比活性を得た。

Table 5-3 Reaction mixture of NylD isozyme assay system (Ahx)

Composition	Final concentration
Amino donor (Ahx)	0.2 mM
Amino acceptor ( $\alpha$ -KG)	0.25 mM
PLP	0.1 mM
NADP <sup>+</sup>	0.25 mM
NylD isozyme (NylD <sub>1</sub> / NylD <sub>2</sub> )	Quantum vis
NylE <sub>1</sub>	0.05 mg/ml
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

Table 5-4 Reaction mixture of NylD isozyme assay system (GABA)

Composition	Final concentration
Amino donor (GABA)	0.2 mM
Amino acceptor ( $\alpha$ -KG)	0.25 mM
PLP	0.1 mM
NADP <sup>+</sup>	0.25 mM
NylD isozyme (NylD <sub>1</sub> / NylD <sub>2</sub> )	Quantum vis
NylE <sub>2</sub>	0.05 mg/ml
100 mM KPB (pH 7.8)	Up to 2 ml

### 5.5.3 NylD/NyE アイソザイムの RT-PCR

#### 5.5.3.1 最少培地による *Arthrobacter* sp.KI72 の培養

3 ml の最少培地(Ahx, GABA, Glucose)に一白金耳の *Arthrobacter* sp. KI72 を植菌し、30°Cで一晩培養を行った。培養液 1 ml を 10 ml の各種最少培地(Ahx, GABA, Glucose)に植菌し、OD<sub>600</sub> = 1.0 となるまで振とう培養を行った。

#### 5.5.3.2 RNA 抽出

OD<sub>600</sub> = 1.0 まで培養した、KI72 株の LB 培養液(30°C, 一晩)10 ml をサンプルチューブに移し、4°C、4000×g で 15 分間遠心分離を行った。上澄みを捨て、1 ml の ISOGEN(ニッポンジーン社)を加えてピペティングにてホモジナイズした後、室温で 5 分間インキュベートした。その後、0.2 ml のクロロホルムを添加し、15 秒間激しく転倒攪拌を行い、室温で 3 分間インキュベートした。溶液を 12000×g、4°Cで 15 分間遠心分離を行い、400 μl の上層(水相)を新しいサンプルチューブに移した。分取した水相に同量(400 μl)の 70%エタノールを添加し、激しく攪拌を行った。RNA の精製は PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies)を用い、取り扱い説明書に準じて行った。Collection tube をつけた Spin Cartridge に 700 μl のサンプル溶液を加え 12000×g、室温で 15 秒間遠心分離を行った。通過後の液を捨て、700 μl の Wash Buffer 1 をカートリッジに加え、同条件で遠心分離を行った。通過後の液を捨て、新しいチューブに Spin Cartridge を移した。次に、500 μl の Wash Buffer 2 を加え、同条件で遠心分離し、通過後の液を捨てた。この Wash Buffer 2 洗浄操作を 2 回行い、12000×g、室温で 2 分間遠心分離後、Spin Cartridge を新しいチューブに移した。Spin Cartridge のシリカメンブレンに Elution buffer(RNase-free Water)を 30~100 μl 加えて室温で 1 分間インキュベートし、12000×g 室温で 2 分間遠心分離し、Total RNA を回収した。

#### 5.5.3.3 RT-PCR

回収した Total RNA は分光光度計により 260 nm での吸光度(A<sub>260</sub>)から以下の式を用いて濃度を測定した。

$$\text{RNA の濃度 (ng/μl)} = 40 \times A_{260} \times \text{希釈率}$$

次に 2×SYBR® Premix Ex taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)を用いて以下のプライマー、組成および条件で、増幅効率が 80~120%となるよう逆転写反応および PCR 法を行った。このとき Total RNA は含有量が 10 ng、1 ng、100 pg、10 pg の希釈系列を用意した。

比較方法として ΔCt 法を用いた。ハウスキーピング遺伝子である 16S rRNA

の Ct 値を内在性コントロールとして、その Ct 値を 100%とし、NylD/NylE の相対発現量を比較した。

Table 5-5 Primers use in this study.

Primer name	5'→3' sequence (restriction enzyme)	Purpose
NylD1-r-F	ACGAACTCTCGTACCGCATC	Amplification of nylD <sub>1</sub> specific sequence
NylD1-r-R	CCGTCGGCGTCTTCTAC	
NylD2-r-F	TACAGACGCTTTCGGCATC	Amplification of nylD <sub>2</sub> specific sequence
NylD2-r-R	ACCGACGCTGGTGACTG	
NylE1-r-F	AGTTCCGCGATCACACAC	Amplification of nylE <sub>1</sub> specific sequence
NylE1-r-R	CCTCCTTGTTGGTGATCTCG	
NylE2-r-F	TGAACGCGAAAGCGAAC	Amplification of nylE <sub>2</sub> specific sequence
NylE2-r-R	GCGTCGGAGATGCTGAG	
16SrRNA-r-F	CTGGGATAAGCCTGGGAAAC	Amplification of 16SrRNA specific sequence
16SrRNA-r-R	TACCCACCAACAAGCTG	

Table 5-6 Composition of RT-PCR reaction mixture for NylD<sub>1</sub>

2 × SYBR® Premix Ex taq™ II (Tli RNaseH Plus)	12.5 µl
PCR Forward Primer (10 µM)	1 µl (0.4 µM final conc.)
PCR Reverse Primer (10 µM)	1 µl (0.4 µM final conc.)
Total RNA	10 ng/ 1 ng/ 100 pg/ 10 pg
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 25 µl

Table 5-7 Composition of RT-PCR reaction mixture for NylD<sub>2</sub>, NylE<sub>1</sub> and 16SrRNA

2 × SYBR® Premix Ex taq™ II (Tli RNaseH Plus)	12.5 µl
PCR Forward Primer (10 µM)	0.5 µl (0.2 µM final conc.)
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl (0.2 µM final conc.)
Total RNA	10 ng/ 1 ng/ 100 pg/ 10 pg
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 25 µl

Table 5-8 Composition of RT-PCR reaction mixture for NylE<sub>2</sub>

2 × SYBR® Premix Ex taq™ II (Tli RNaseH Plus)	12.5 µl
PCR Forward Primer (10 µM)	1.75 µl (0.7 µM final conc.)
PCR Reverse Primer (10 µM)	1.75 µl (0.7 µM final conc.)
Total RNA	10 ng/ 1 ng/ 100 pg/ 10 pg
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 25 µl

Table 5-9 RT-PCR program

42°C		5 min
95°C		10 sec
95°C	40 cycles	5 sec
60°C		30 sec

## 5.6 実験結果および考察

### 5.6.1 発現プラスミドの構築と精製

NylD/NylE アイソザイムの機能を確認するため、酵素の取得を試みた。KI72 株ゲノムより NylD/NylE 配列を PCR により増幅し、制限酵素的に断片を消化した後、同様に制限酵素的に消化した pCold ベクターに挿入することで発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドは大腸菌に形質転換し、培養により目的タンパク質を大量発現し、最終的には His-tag 融合タンパク質として精製を行った。その結果、高純度の、十分量の目的タンパク質を取得することができた(Fig. 5-1)。

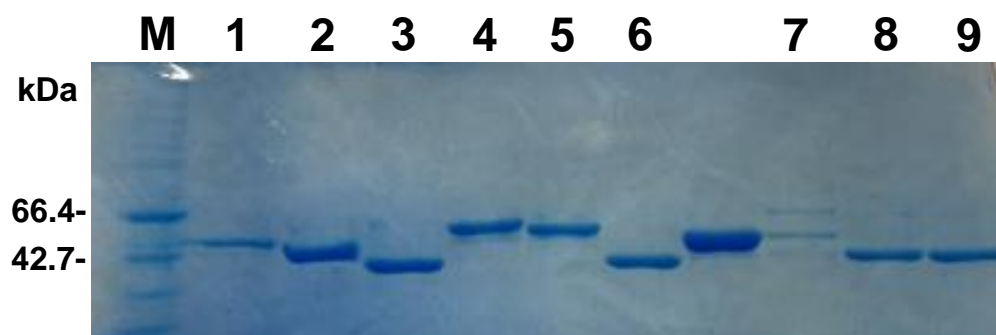


Fig. 5-1 SDS-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis.

Slot 1, NylE<sub>1</sub>; slot 2, NylE<sub>2</sub>; slot 3, NylE<sub>3</sub>; slot 4, NylE<sub>4</sub>; slot 5, NylE<sub>5</sub>; slot 6, NylE<sub>6</sub>; slot 7, NylE<sub>8</sub>; slot 8, NylD<sub>1</sub>; slot 9, NylD<sub>10</sub>; slot M, molecular weight standard proteins

## 5.6.2 活性測定

### 5.6.2.1 NylE アイソザイムのアッセイ(酸化反応)

NylE アイソザイムの酸化活性を確認するため、化学合成した ASA および SSA を基質として、NADP<sup>+</sup>もしくは NAD<sup>+</sup>を補酵素として酵素反応を行った。NADPH もしくは NADH の 340nm(A<sub>340</sub>)吸収をモニターすることで酵素反応の初速度を評価した。ASA を基質とした反応では、補酵素を NADP<sup>+</sup>もしくは NAD<sup>+</sup>とした反応でともに、NylE<sub>1</sub>で最も高い活性が確認された(Fig. 5-2~3)。一方、SSA を基質とした反応では、補酵素を NADP<sup>+</sup>もしくは NAD<sup>+</sup>とした反応でともに、NylE<sub>1</sub>で最も高い活性が確認された。この結果は、NylE<sub>1</sub>は Ahx/Adipate 代謝に、NylE<sub>2</sub>は GABA/Succinate 代謝に関連する酵素であることを示唆している。また、NylE<sub>6</sub>では ASA と比較して SSA を基質としたもので活性が高いといった結果が得られたが、それ以外の NylE アイソザイムでは、系統学的に ASALDH に分類した NylE<sub>1</sub>および NylE<sub>3</sub>では ASA の活性が高く、SSALDH に分類した NylE<sub>2</sub>、NylE<sub>4</sub>、NylE<sub>5</sub>および NylE<sub>8</sub>では SSA の活性が高いことが確認できた。このことは、第 4 章で行った系統学的分類の妥当性を裏付けるものである。

また、この実験では補酵素として NADP<sup>+</sup>および NAD<sup>+</sup>を用いたが、どの NylE アイソザイムについても反応の進行が確認された。この結果より、すべての NylE アイソザイムは NADP<sup>+</sup>および NAD<sup>+</sup>を補酵素として利用できることを示している。併せて、NylE アイソザイムの NADP<sup>+</sup>および NAD<sup>+</sup>の活性比を NADP<sup>+</sup>の活性を 100%と仮定して確認した(Fig. 5-4)。その結果、ASA および SSA を基質としたものともに、NylE<sub>2</sub>については NADP<sup>+</sup>および NAD<sup>+</sup>を補酵素とした活性は同等であったが、それ以外のアイソザイムにおいては NADP<sup>+</sup>で高い活性を確認できた。このことは、これらのアイソザイムが NADP<sup>+</sup>選択性をもつことを示している。

Table 5-10 Reductive activity of NylE isozyme using NADP<sup>+</sup> as coenzyme.

ALDH subfamily	NylE	Specific activity (μmol/min/mg)	
		ASA	SSA
ASALDH	NylE <sub>1</sub>	28.67	0.04
	NylE <sub>3</sub>	0.35	0.02
	NylE <sub>6</sub>	0.10	0.66
	NylE <sub>2</sub>	0.25	22.60
SSALDH	NylE <sub>4</sub>	0.39	14.58
	NylE <sub>5</sub>	0.04	0.62
	NylE <sub>8</sub>	0.04	3.86

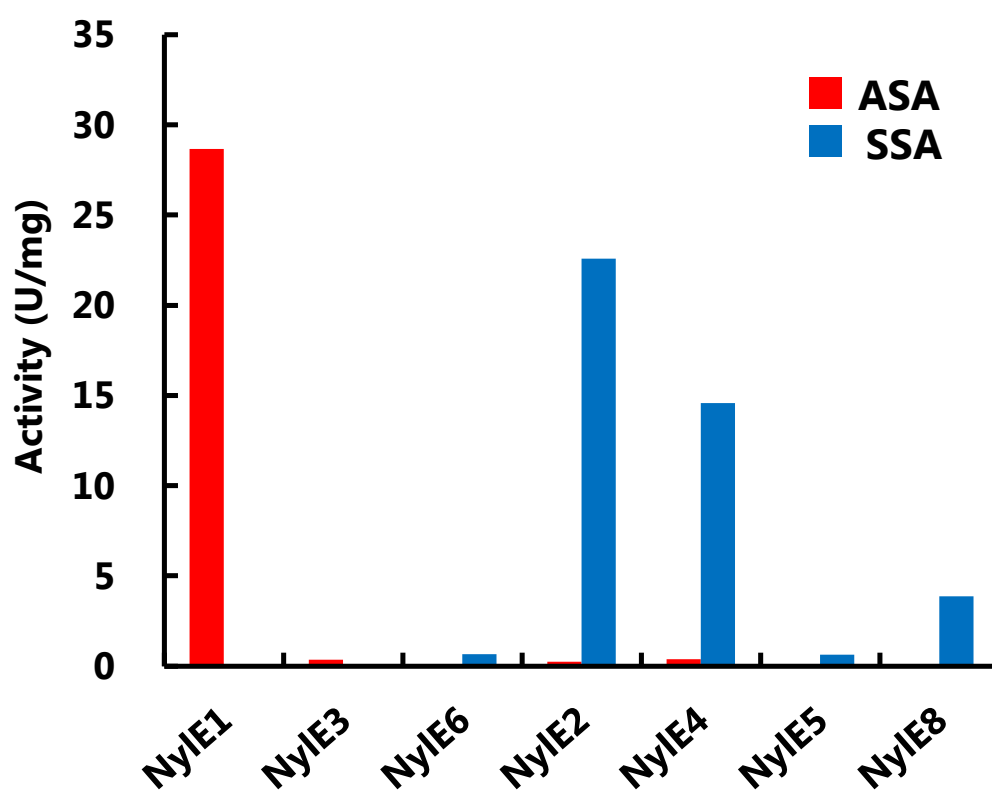


Fig. 5-2 Reductive activity of NylE isozyme using NADP<sup>+</sup> as coenzyme.



Table 5-11 Reductive activity of NylE isozyme using NAD<sup>+</sup> as coenzyme.

ALDH subfamily	NylE	Specific activity (μmol/min/mg)	
		ASA	SSA
ASALDH	NylE <sub>1</sub>	14.48	0.02
	NylE <sub>3</sub>	0.04	0.01
	NylE <sub>6</sub>	0.05	0.19
	NylE <sub>2</sub>	0.25	14.02
SSALDH	NylE <sub>4</sub>	0.14	1.04
	NylE <sub>5</sub>	0.03	0.53
	NylE <sub>8</sub>	0.02	0.27

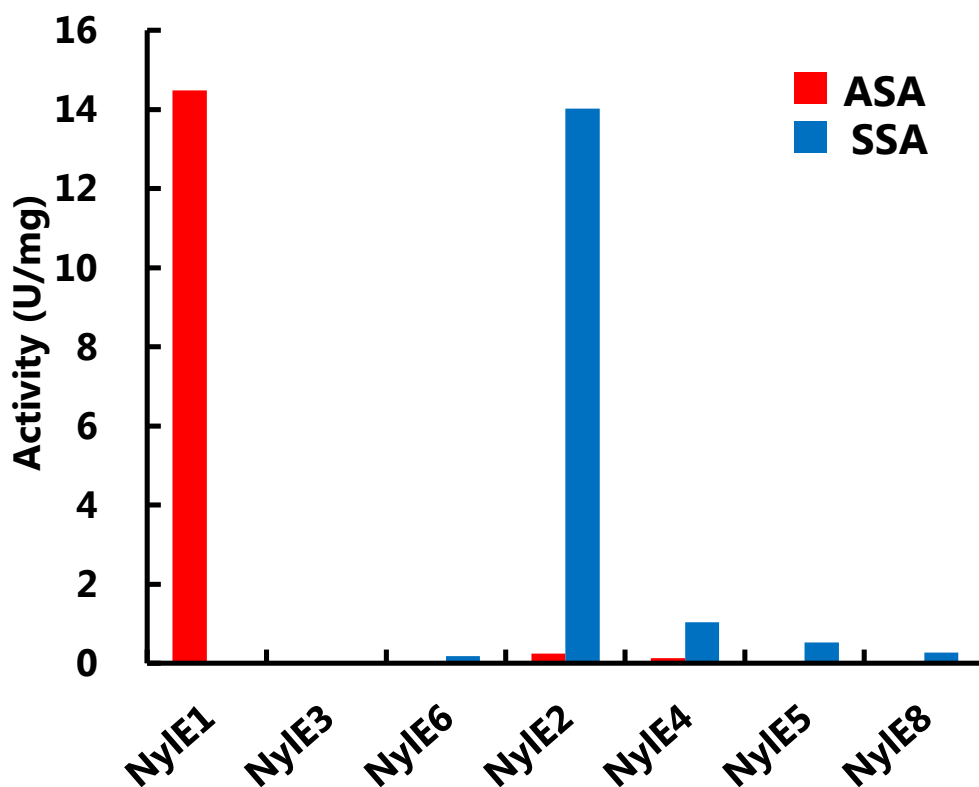
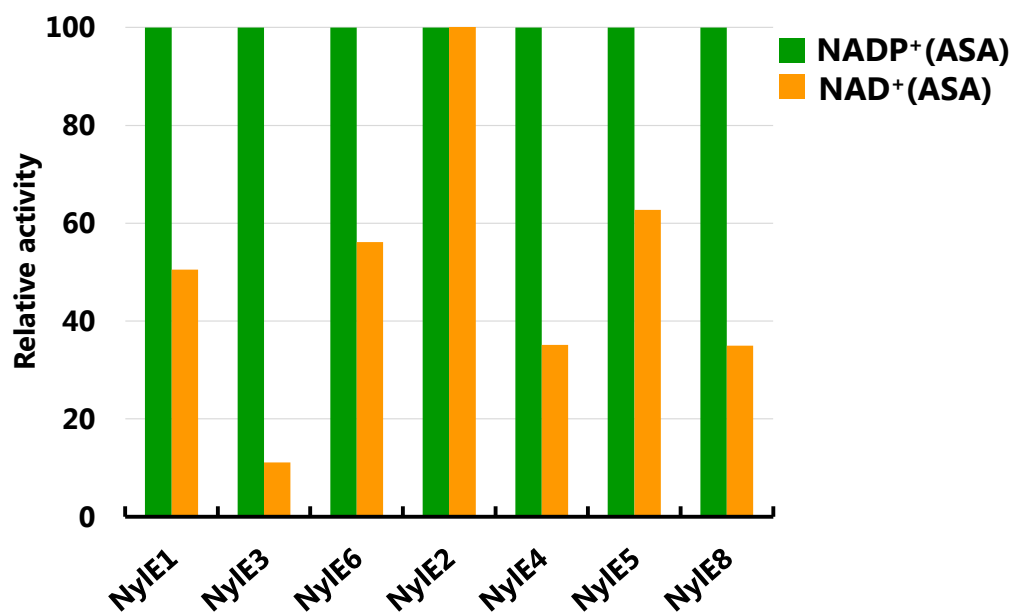


Fig. 5-3 Reductive activity of NylE isozyme using NAD<sup>+</sup> as coenzyme.

**A**



**B**

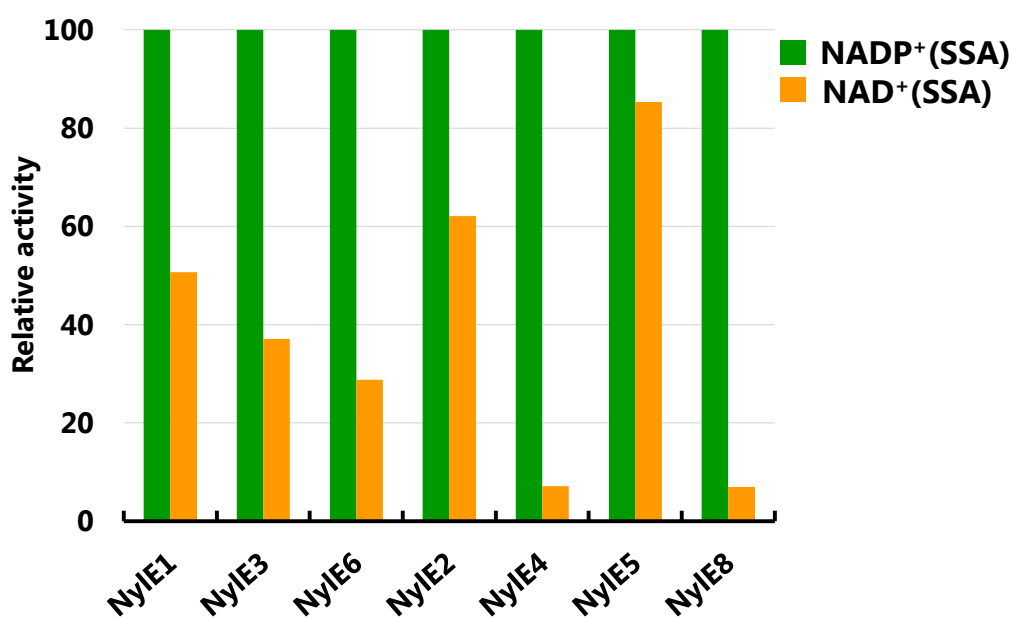


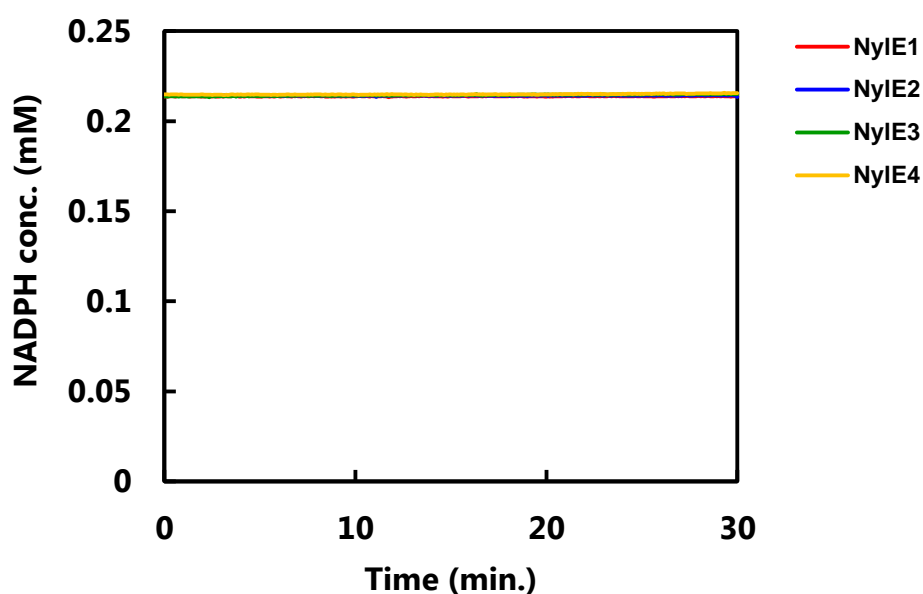
Fig. 5-4 Relative activity of NylE isozyme using NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup> as coenzyme.

Reaction using with ASA (A) and SSA (B) as a substrate

#### 5.6.2.2 NylE アイソザイムのアッセイ(還元反応)

NylE アイソザイム(NylE<sub>1</sub>~NylE<sub>4</sub>)の酸化活性を確認するため、アジピン酸を基質として、また NADPH および NADP を補酵素として酵素反応を行った (Fig. 5-5)。NADPH および NADP の 340nm(A<sub>340</sub>)吸収をモニターすることで酵素反応の進行を確認した。その結果、NADPH および NADP を補酵素としたものでともにどの NylE アイソザイムでも A<sub>340</sub> の変動は確認できなかった。このことから、NylE アイソザイム(NylE<sub>1</sub>~NylE<sub>4</sub>)は酸化反応に特異的であることが明らかとなった。

**A**



**B**

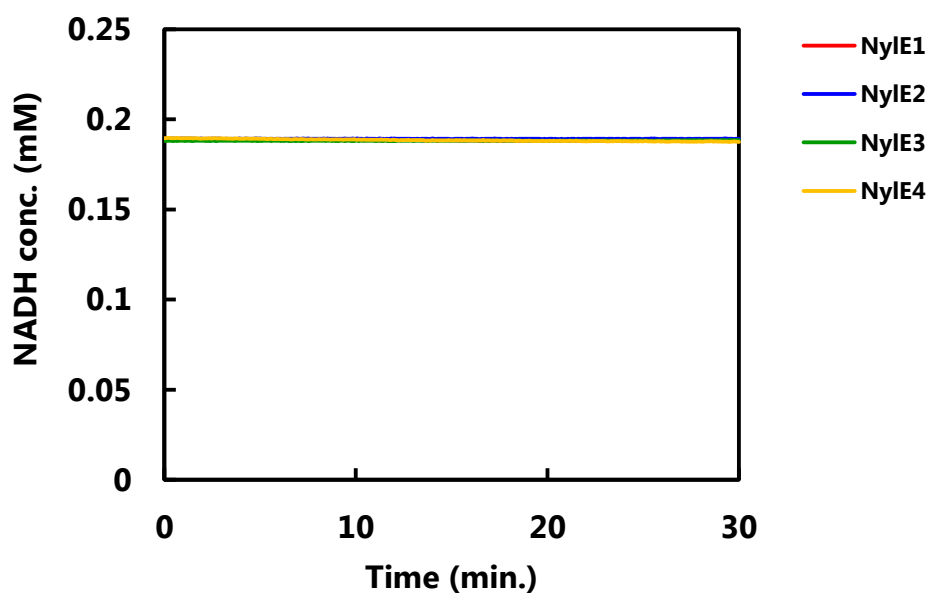


Fig. 5-5 Time course of NylE isozyme reductive reaction.  
Reaction using with NADPH (A) and NAD (B) as a coenzyme

### 5.6.2.3 NylD アイソザイムのアッセイ

NylD アイソザイム(NylD<sub>1</sub>/NylD<sub>2</sub>)の Ahx および GABA 活性を NylD/NylE 共役系を用いて測定した。また、 $\alpha$ -KG をアミノ基受容体として用いた。第 4 章で述べたとおり、共役系を用いた測定系では NylE が NylD の反応速度を大きく上回っている必要がある。先の実験により、NylE<sub>1</sub> は ASA を基質とした反応特異性が高く、一方で NylE<sub>2</sub> は SSA を基質とした反応特異性が高いことが確認されたため、NylE<sub>1</sub> は Ahx 変換活性を NylE<sub>2</sub> は GABA 変換活性を測定できる共役系への適用に適していると判断した。その結果、NylD<sub>1</sub>/NylD<sub>2</sub> ともに Ahx および GABA としての反応において、反応の進行を示す A<sub>340</sub> の増加が確認された(Fig. 5-6 A, B and C)。この結果より、NylD<sub>1</sub> はすでに Ahx/GABA 変換活性基質を有することが確認されていたが(第 4 章)、NylD<sub>2</sub> もその活性を有することが明らかとなった。また、NylD<sub>1</sub>/NylD<sub>2</sub> ともに Ahx および GABA としての反応において、比活性を求めるためにその酵素濃度を変化させ、初速度-タンパク質濃度プロットを取得したが、直線的良好なプロットを得ることができた(Fig. 5-6 E and F)。このことは、NylE<sub>1</sub> および NylE<sub>2</sub> で適切に Ahx および GABA 活性を測定できていることを示している。その活性を確認したところ、Ahx/GABA 両基質を用いた反応系で、NylD<sub>1</sub> と比較し NylD<sub>2</sub> の活性が高いことが確認された(Table 5-12)。しかし、それぞれの酵素の GABA/Ahx 活性比を確認すると、NylD<sub>1</sub> が約 48 倍であるのに対し、NylD<sub>2</sub> は約 7 倍であった。これは、NylD<sub>1</sub> がより GABA に特異性が高いことを示している。また、NylD<sub>1</sub> は機能の解析が進んでいる Ara-GABT(GABA aminotransferase from *Arthrobacter aurescens*)と 95%の相同性がある。これらより、NylD<sub>1</sub> は GABA 代謝の、NylD<sub>2</sub> は Ahx 代謝の主役酵素であることが考えられる。

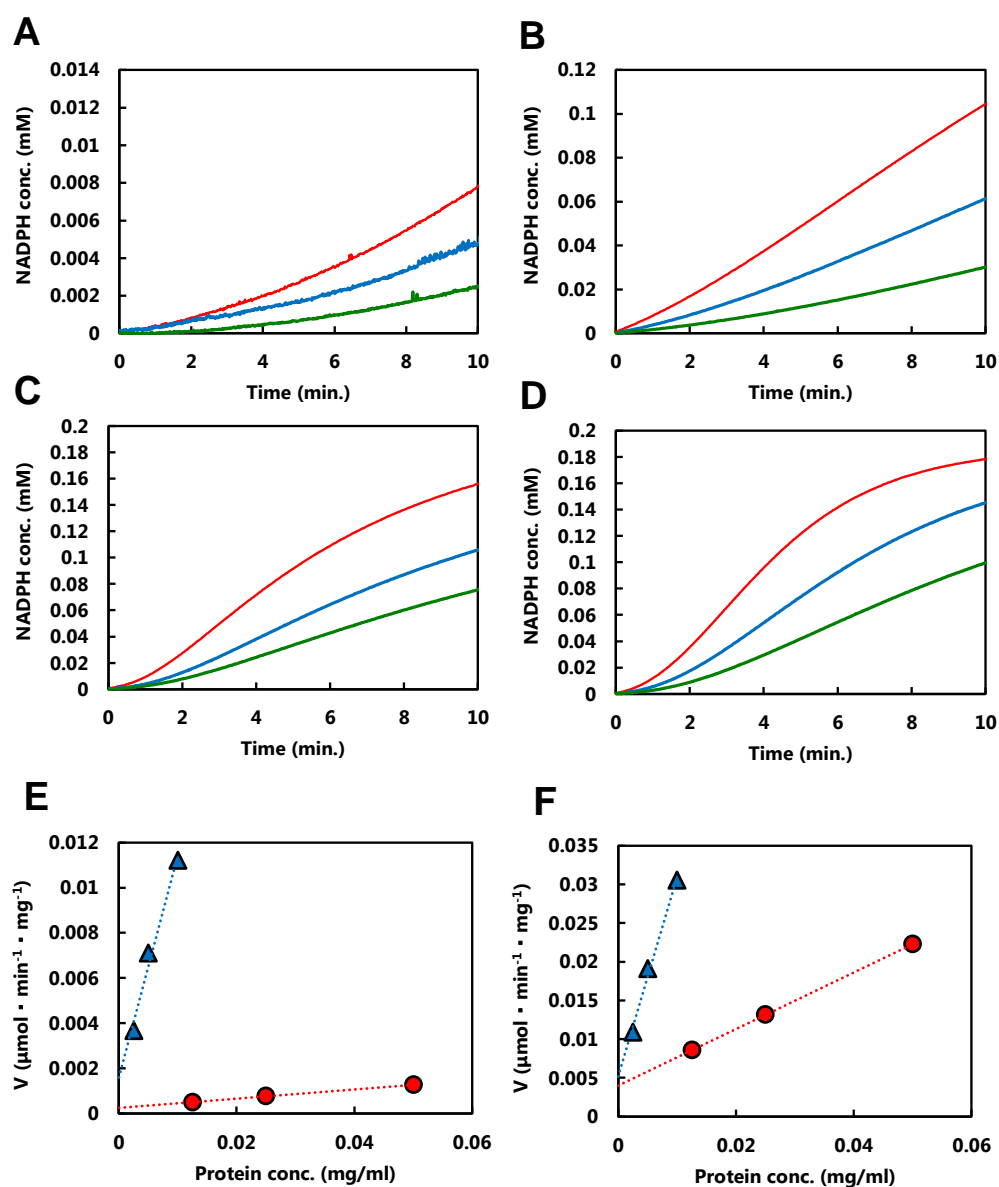


Fig. 5-6 Time course of NyID/NylE coupled reaction at different enzyme concentration.

The coupled reaction was performed by changing the ratio of NyID and NylE activity in the standard assay conditions. NyID<sub>1</sub> enzyme activity was assayed using Ahx (A) or GABA (B) as substrate. NyID<sub>2</sub> enzyme activity was assayed using Ahx (C) or GABA (D) as substrate. NyID/NylE<sub>1</sub> = 0.05/0.05 mg/ml (1, 7); 0.025/0.05 mg/ml (2, 8); 0.0125/0.05 mg/ml (3, 9). NyID/NylE<sub>2</sub> = 0.01/0.05 mg/ml (4, 10); 0.005/0.05 mg/ml (5, 11); 0.0025/0.05 mg/ml (6, 12). NyID<sub>1</sub> (E) and NyID<sub>2</sub> (F) aminotransferase activity was calculated from the reaction rate in the complete system. The activity was plotted for the protein concentrations of NyID. Ahx (red circles); GABA (blue triangles).

Table 5-12 Summary of NylD isozyme aminotransferase activity.

Substrate	Ahx	GABA	Relative activity (GABA/Ahx)
NylD <sub>1</sub>	0.02	0.98	47.8
NylD <sub>2</sub>	0.37	2.58	7.1
Relative activity (NylD <sub>2</sub> /NylD <sub>1</sub> )	17.8	2.6	

### 5.6.3 NylD/NyE アイソザイムの RT-PCR

最少培地(Ahx, GABA, Glucose)における NylD アイソザイム(NylD<sub>1</sub>/NylD<sub>2</sub>)および NylE アイソザイム(NylE<sub>1</sub>/NylE<sub>2</sub>)の発現量を確認するため、各最少培地において KI72 株を培養した後に RNA 抽出を行い、この Total RNA をサンプルとした RT-PCR を行った。ハウスキーピング遺伝子である 16S rRNA の Ct 値を内在性コントロールとして、その Ct 値を 100% とし、NylD/NylE の相対発現量を比較したところ、各培地間で目立った変動がみられたアイソザイムは確認できなかった。この結果より、NylD アイソザイム(NylD<sub>1</sub>/NylD<sub>2</sub>)および NylE アイソザイム(NylE<sub>1</sub>/NylE<sub>2</sub>)は恒常的に発現しているタンパク質であることが明らかとなった。

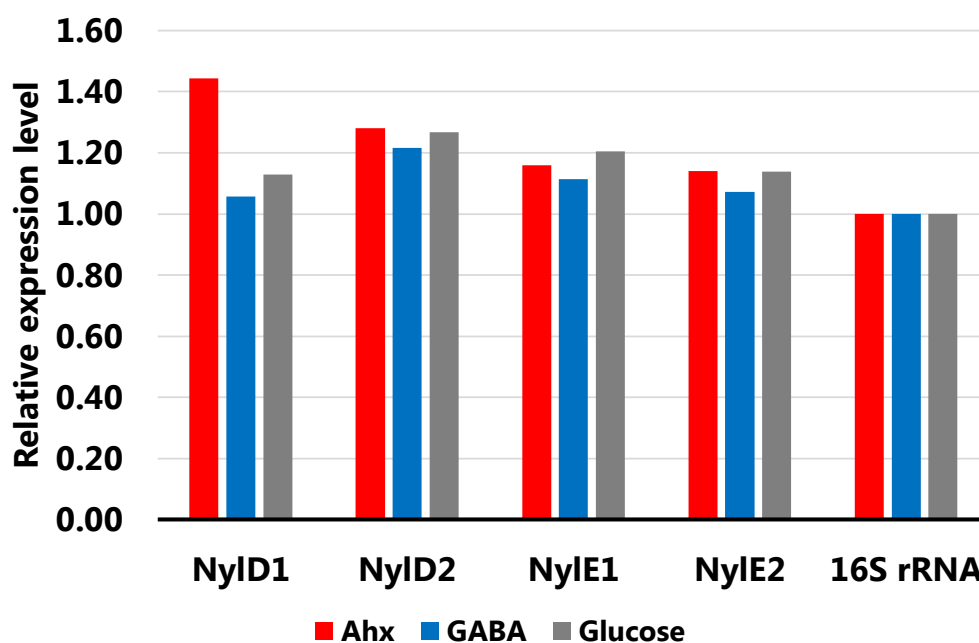


Fig. 5-7 Relative expression level of NylD/NyE isozymes in different culture media.

## 5.7 結論

本章では、NylD/NylE アイソザイムの生化学的特徴づけを行い、それらが KI72 株の Ahx 代謝にどのように関連しているかを確認した。NylE アイソザイムのアッセイにより、Ahx/Adipate 代謝には NylE<sub>1</sub> が、GABA/Succinate 代謝には NylE<sub>2</sub> が関連していることが示唆された。また、NylE は酸化反応に特異的な酵素でその反応においては NADP<sup>+</sup> 選択性を有することが確認された。NylE アイソザイムのアッセイでは NylD<sub>2</sub> において基質を Ahx/GABA としたものの双方でアミノ基転移活性が高いことが確認された。この結果は、NylD<sub>1</sub> は GABA 代謝の、NylD<sub>2</sub> は Ahx 代謝の主役酵素であることを示唆している。

## 参考文献

- 1) Bartsch K, von Johnn-Marteville A, Schulz A (1990) Molecular analysis of two genes of the *Escherichia coli* *gab* cluster: nucleotide sequence of the glutamate:succinic semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). J Bacteriol 172:7035-7042
- 2) Bruce H, Nguyen Tuan A, Mangas Sanchez J, Leese C, Hopwood J, Hyde R, Hart S, Turkenburg JP, Grogan G (2012) Structures of a  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) transaminase from the *s*-triazine-degrading organism *Arthrobacter aurescens* TC1 in complex with PLP and with its external aldimine PLP–GABA adduct. Acta Crystallogr Sect F68: 1175-1180
- 3) de Carvalho LP, Ling Y, Shen C, Warren JD, Rhee KY (2011) On the chemical mechanism of succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD1) from *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Biochem Biophys 509:90-99. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.023>
- 4) Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. Eur J Biochem 214:549-561
- 5) Negoro S (2000) Biodegradation of nylon oligomers. Appl Microbiol Biotechnol 54:461-466. <https://doi.org/10.1007/s002530000434>
- 6) Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. Protein Sci 8:137–146
- 7) Phillips RS (2015) Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. Biochim Biophys Acta. 1854: 1167-1174. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.028.
- 8) Sanchez M, Fernández J, Martin M, Gibello A, Garrido-Pertierra A (1989) Purification and properties of two succinic semialdehyde dehydrogenases from *Klebsiella pneumoniae*. Biochim Biophys Acta 990:225-231
- 9) Schirotti D, Peracchi A (2015) A subfamily of PLP-dependent enzymes specialized in handling terminal amines. Biochim Biophys Acta 1854: 1200-1211. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.02.023.
- 10) Schneider BL, Ruback S, Kiupakis AK, Kasbarian H, Pybus C, Reitzer L (2002) The *Escherichia coli* *gabDTPC* operon: specific  $\gamma$ -aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. J Bacteriol 184:6976-6986. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6976-6986.2002>
- 11) Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. Trends in Plant Science 4: 446-452
- 12) Sophos NA, Vasiliou V (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. Chem. Biol Interact 143-144:5-22
- 13) Steffen-Munsberg F, Vickers C, Kohls H, Land H, Mallin H, Nobili A, Skalden L, van den Bergh T, Joosten HJ, Berglund P, Höhne M, Bornscheuer UT (2015) Bioinformatic analysis



of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnol Adv* 33:566-604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.012

- 14) Storici P, De Biase D, Bossa F, Bruno S, Mozzarelli A, Peneff C, Silverman RB, Schirmer T (2004) Structures of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with  $\gamma$ -ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin. *J Biol Chem* 279: 363-373
- 15) Strong LC., Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse *s*-triazine ring compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5973-5980
- 16) Takehara I, Kato DI, Takeo M, Negoro S (2017) Draft genome sequence of the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain KI72. *Genome Announc* 5: pii: e00217-17. doi: 10.1128/genomeA.00217-17.
- 17) Turk SC, Kloosterman WP, Ninaber DK, Kolen KP, Knutova J, Suij E, Schürmann M, Raemakers-Franken PC, Müller M, de Wildeman SM, Raamsdonk LM, van der Pol R, Wu L, Temudo MF, van der Hoeven RA, Akeroyd M, van der Stoep RE, Noorman HJ, Bovenberg RA, Trefzer AC (2016) Metabolic engineering toward sustainable production of nylon-6. *ACS Synth Biol* 5: 65-73 .doi:10.1021/acssynbio.5b00129

## 第6章

### NyID 結晶化条件の検討

#### 6.1 諸言

前章までに NyID は PLP 依存性アミノ基転移活性を持つことが明らかとなったが、一般的な PLP 依存性アミノ基転移反応では  $\alpha$ -アミノ酸を基質として反応が進行する (Fig. 6-1)。PLP 依存性アミノトランスフェラーゼでは、活性部位のリシン残基側鎖のアミノ基に、PLP のカルボニル基が Schiff 塩基を形成して結合している (内部アルジミン)。反応は PLP と  $\alpha$ -アミノ酸との結合により開始し、その結果イミノ基の転移が起こり、PLP と  $\alpha$ -アミノ酸の間に Schiff 塩基が形成される (外部アルジミン)。その後の触媒過程で  $\alpha$ -アミノ酸のアミノ基は PLP に結合したまま (ピリドキサミン酸 (PMP)) で 2-オキソ酸が遊離する。ここに別の 2-オキソ酸が入り、逆方向に反応が進行することで、PLP 型酵素の再生および  $\alpha$ -アミノ酸の遊離が起こり、反応が完結する。

一方で、 $\gamma$ -アミノ酸を基質としてアミノ基転移反応を触媒する酵素 Ara-GABT (GABA aminotransferase from *Arthrobacter aureescens*) はその結晶構造解析により、反応機構の解析が進んでいる。基質および補酵素を共存させたタンパク質結晶構造触媒中心の解析により、Ara-GABT はアミノ基結合位置が異なるアミノ酸 ( $\gamma$ -アミノ酸) を、一般的なアミノトランスフェラーゼと同様の反応機構で触媒していることが明らかとなっている。このように結晶構造解析からはそのタンパク質の機能や反応機構を理解するための有用な情報を得ることができる。

NyID は  $\epsilon$ -アミノ酸である Ahx を基質として反応できることがすでに明らかとなっているが、一般的な  $\alpha$ -アミノ酸を基質とする酵素と比較し、その基質認識能にユニークさがある。本章では、NyID<sub>1</sub> の機能および反応機構を理解するため、結晶化条件の検討を行った。

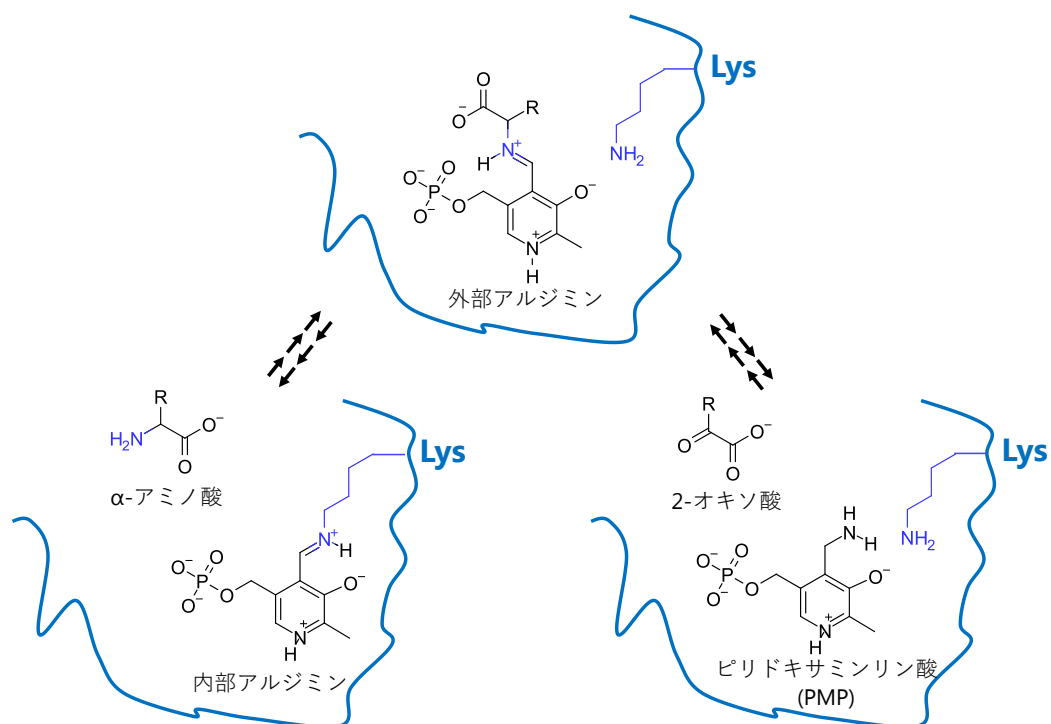


Fig. 6-1 PLP 依存性アミノ基転移反応の反応機構

## 6.2 実験材料

### 6.2.1 使用菌株、プラスミドおよび酵素 第4章に準じた。

### 6.2.2 使用機器

第1章および第4章に準じた。

### 6.2.3 使用培地

第4章に準じた。

## 6.3 実験方法

### 6.3.1 酵素精製

#### 6.3.1.1 His-tag 精製

第4章に準じた。ただし、透析操作は実施しなかった。

#### 6.3.1.2 ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-200 HR)

全量約 1 ml に濃縮したサンプルを、あらかじめ 50 mM リン酸カリウムバッファ (pH. 7.0) で平衡化しておいた Sephacryl S-200 HR カラム (φ 16 mm × 65 cm) に

チャージし、50 mM リン酸カリウムバッファ(pH. 7.0)で溶出を行った。流速は 0.5 ml/min とし、溶出開始から 50 分後に分取を開始し、2 ml ずつ 30 本分取した。Amicon Ultra (MILLIPORE 製, 分画分子量 10kDa)を用いて遠心濃縮(4°C, 4,000×g, 30 min)し、精製酵素とした。酵素濃度はウシ血清アルブミンを標準として、Bladford アッセイにより定量した。酵素濃度を 20 mg/ml となるよう調製し、結晶化酵素溶液とした。

## 6.3.2 NylD<sub>1</sub> の結晶化

### 6.3.2.1 結晶化条件のスクリーニング

結晶化溶液に基質として Ahx、補酵素として PLP および生成物としてグルタミン酸を添加したものを結晶化サンプルとした(Table 6-1)。結晶化スクリーニングキット(Table 6-2)を使用し、の結晶化を行った。結晶化には 96 well の結晶化プレート (Crystal Clear Strips RG17 7HD, Hampton Research 社)を用い、Sitting drop 蒸気拡散法で行った。まず、結晶化プレートのサンプル用ウェルに 1  $\mu$ l の結晶化サンプルをアプライした。次に、スクリーニングキットの沈殿剤溶液をそれぞれプレートのリザーバーに 60  $\mu$ l 添加し、そのリザーバーから 1  $\mu$ l の沈殿剤溶液を分取し、先にアプライしておいた結晶化サンプルと混合した。シーリングにより密閉した後、4°Cおよび 20°Cで数日間放置し、顕微鏡にて結晶の有無を確認した。

Table 6-1 Composition of crystallization sample.

Composition	Concentration (final conc.)
NylD <sub>1</sub>	20 mg/ml
Ahx	20 $\mu$ M
PLP	0.1 mM
Glutamate	0.1 mM

Table 6-2 List of crystallization kit use in this study.

Crystallization kit	Manufacturer
JBScreen Classic HTS I	Jena Bioscience
JBScreen Classic HTS II	
JBScreen JCSG++ HTS	
Stura FootPrint Combination HT-96	Molecular Dimensions
ProPlex™ HT-96	
Clear Strategy™ Screen I HT-96	

#### 6.3.2.2 結晶化条件の最適化

結晶化スクリーニングにより得られた、結晶化条件を最適化するため、条件を振って結晶化を行った。

#### 6.3.3 NylD<sub>1</sub> の X 線回折強度データの回収

結晶化したサンプルを兵庫県立大学大学院生命理学研究科 生体物質構造学 I 分野 柴田准教授に依頼し、データを取得した。

#### 6.3.4 NylD アイソザイムのアライメント

NylD とその他関連配列を Clustal W プログラム

(<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>, Larkin et al. 2007.)を用いて、アライメントを行った。

### 6.4 実験結果および考察

#### 6.4.1 酵素精製

pCold-NylD<sub>1</sub> プラスミドを大腸菌に形質転換し、培養により目的タンパク質を大量発現し、His-tag 融合タンパク質として精製を行った。その後、タンパク質分子の凝集を避けるため、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、高純度の、十分量の目的タンパク質を取得することができた。

#### 6.4.2 NylD<sub>1</sub> の結晶化

##### 6.4.2.1 結晶化条件のスクリーニング

複数の条件で X 線回折強度データが取得可能な大きさの柱状の結晶を得ることができた(Table 6-3, Fig. 6-2)。また、結晶は 20°C の条件でのみ得ることができた。

Table 6-3 Crystallization condition of NylD<sub>1</sub>.

Crystallization kit	Salt	Buffer	pH	Precipitant 1	Precipitant 2
JBScreen Classic HTS I	100 mM	100 mM		15% w/v	
	Calcium chloride	Sodium acetate	4.6	Polyethylene glycol 400	-
	200 mM	100 mM		30% w/v	
	tri-sodium citrate	Tris	8.5	Polyethylene glycol 400	-
				15% w/v	
	-	-	-	Polyethylene glycol 8,000	
JBScreen Classic HTS II	200 mM	100 mM		18% w/v	
	calcium acetate	HEPES	7.5	Polyethylene glycol 8,000	-
	200 mM			30% w/v	
	Ammonium sulfate	-	-	Polyethylene glycol 8,000	
	50 mM	100 mM		12% v/w 2-	
	Magnesium chloride	Tris	8.5	Methyl-2,4-pentanediol	-
JBScreen JCSG++ HTS Stura FootPrint Combination HT-96		100 mM		30% v/w 2-	10% w/v
	-	100 mM	8.0	Methyl-2,4-pentanediol	Polyethylene glycol 4,000
		100 mM	7.5	20% v/v Jeffamine® M-600	-
ProPlex™ HT-96		200 mM		20% w/v	
	-	Imidazole malate	6.0	Polyethylene glycol 4,000	-
	200 mM	100 mM		20% w/v	
Clear Strategy™	Sodium chloride	Tris	8.0	Polyethylene glycol 4,000	
	100 mM	100 mM		12% w/v	
	Magnesium acetate	MOPS	7.5	Polyethylene glycol 8,000	-
	200 mM	100 mM	6.5	15% w/v	-

Screen I HT-96	Lithium sulfate 200 mM	Sodium cacodylate 100 mM	7.5	Polyethylene glycol 4,000 15% w/v	-
	Lithium sulfate	Tris		Polyethylene glycol 4,000	

---

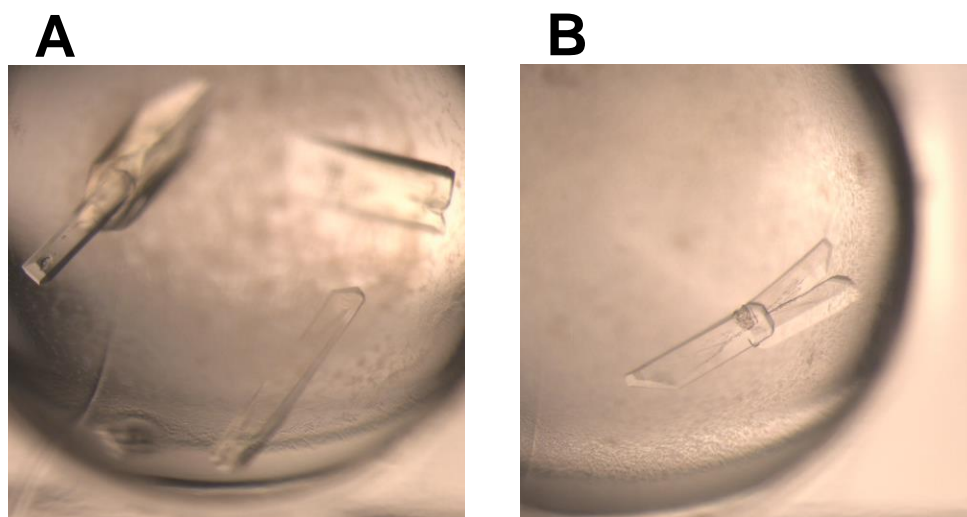


Fig. 6-2 Crystal of NylD<sub>1</sub>.

The screen formation are 200 mM Sodium chloride, 100 mM Tris (pH 8.0) and 20% w/v Polyethylene glycol 4,000 (**A**); 200 mM Lithium sulfate, 100 mM Sodium cacodylate (pH 6.5) and 15% w/v Polyethylene glycol 4,000 (**B**).

#### 6.4.2.2 結晶化条件の最適化

予備的な X 線回折強度データ取得の結果、200 mM Sodium chloride, 100 mM Tris (pH 8.0) and 20% w/v Polyethylene glycol (PEG) 4,000 の条件で分解能の高い回折データを取得できることが確認されたので、さらに精度の高いデータを得るため結晶化条件の最適化を行った。最適化は pH と沈殿剤である PEG の濃度条件を振ることで行った。pH は結晶化した pH 8.0 を基準に 0.5 間隔で 7.0~9.0 の範囲で変化させた。また、PEG の濃度は結晶化した濃度 20% を基準に 2% 間隔で 16%~24% の範囲で変化させた。その結果、1) pH 7.0, PEG 4,000 24% v/w, 2) pH 8.0, PEG 4,000 22% v/w, 3) pH 8.0, PEG 4,000 24% v/w の 3 条件で大きな結晶を確認できた(Fig. 6-3)。このことより、結晶化条件の最適化ができたと判断し、これらの結晶を X 線回折データ取得用サンプルとした。

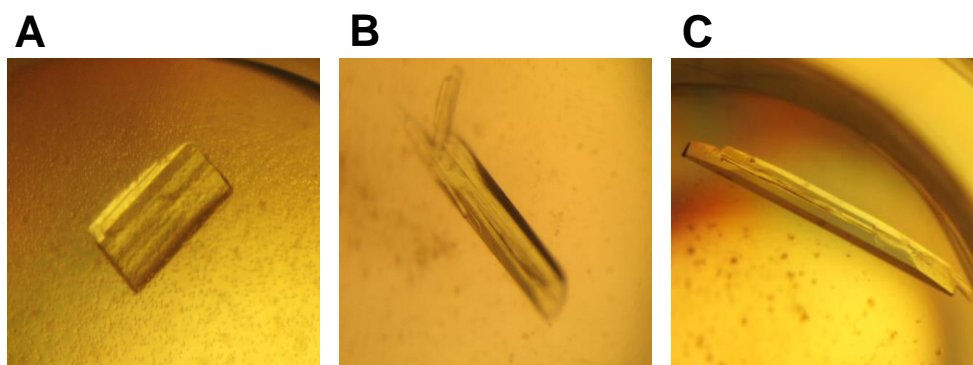


Fig. 6-3 Optimized crystal of NyID<sub>1</sub>.

The crystalized condition are pH 7.0, PEG 4,000 24% v/w (A), pH 8.0, PEG 4,000 22% v/w (B) and pH 8.0, PEG 4,000 24% v/w (C).

#### 6.4.3 NyID<sub>1</sub> の X 線回折強度データの回収

上記の実験で結晶化条件を最適化したサンプルを兵庫県立大学大学院生命理科学研究科 生体物質構造学 I 分野 柴田准教授に依頼し、データを取得した。その結果、分解能 1.9 Å の良好な X 線回折強度データを取得することができた。また、構造解析を依頼したところ、格子定数が大きく ( $a=105.45$ ,  $b=175.15$ ,  $c=580.15$ ,  $\alpha=90$ ,  $\beta=90$ ,  $\gamma=90$ )、非対称単位中に 24 分子もの NyID<sub>1</sub> モノマーが存在することが確認された。このように非対称単位中の分子数が多い場合、構造解析が煩雑になる。また、今回の実験では活性部位と思われる部分にリン酸と思われる電子密度が確認され、PLP の結合は確認できなかった(Fig. 6-4)。これらの結果より、リン酸を含まないバッファーやさらなる結晶化条件の最適化が必要と考えられた。



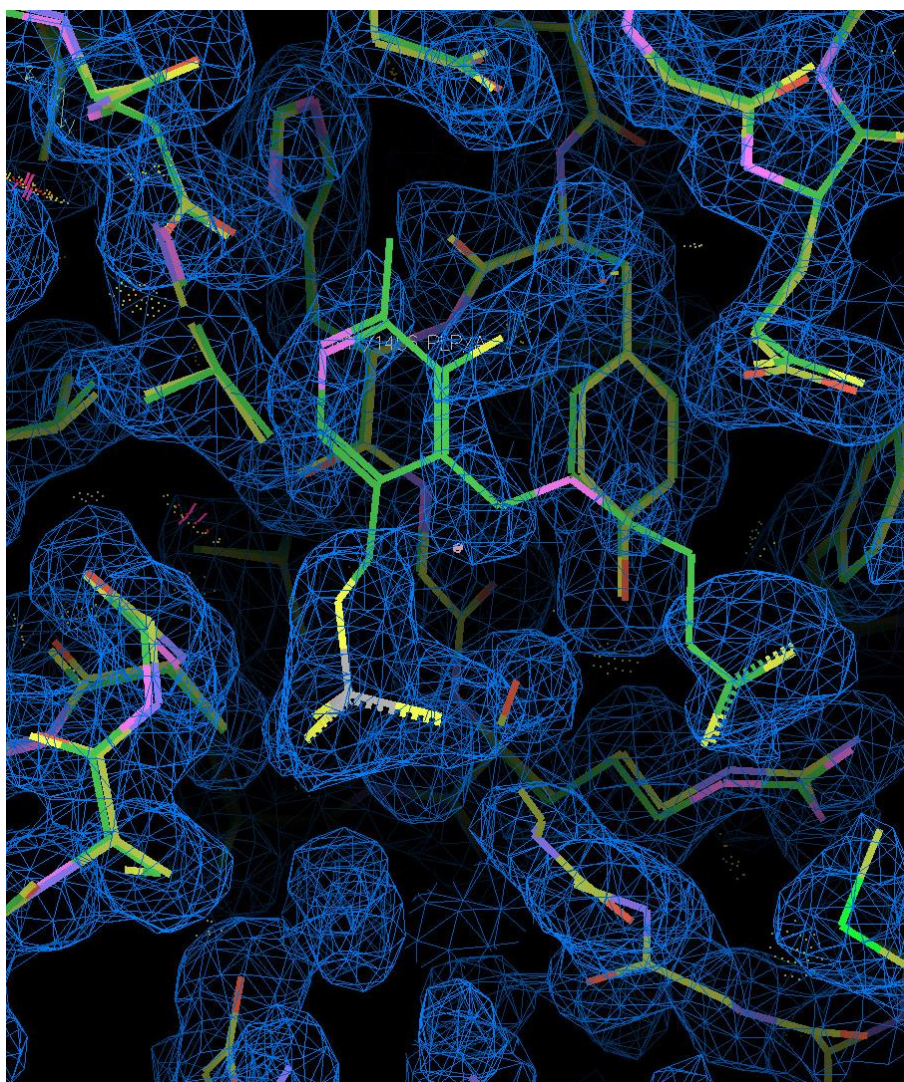


Fig. 6-4 Superimposition of NylD<sub>1</sub> and Ara-GABT electron density map around the active site.

#### 6.4.4 NylD アイソザイムのアライメント

NylD は  $\epsilon$ -アミノ酸である Ahx を基質として反応できることがすでに明らかとなっているが、一般的な  $\alpha$ -アミノ酸を基質とする酵素と比較し、その基質認識能にユニークさがある。NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> の機能および反応機構を理解するため、NylD<sub>1</sub>, NylD<sub>2</sub> および Ara-GABT (GABA aminotransferase from *Arthrobacter aureescens*) のアミノ酸配列のアライメントを行った。 $\gamma$ -アミノ酸を基質としてアミノ基転移反応を触媒する酵素 Ara-GABT はその結晶構造解析がすでに行われており、PLP とカルボニル基が Schiff 塩基を形成して結合した構造(内部アルジミン)および PLP と GABA が Schiff 塩基を形成して結合

した構造(外部アルジミン)が明らかとなっている(Fig. 6-5)。その結晶構造解析により、この酵素の反応にかかわる触媒中心のアミノ酸残基とその作用が確認されている(Table 6-4)。また、Eco-GABT (GABA aminotransferase from *E. coli*)と比較して、Ara-GABT では触媒中心に存在するアミノ酸がよく保存されており、Ara-GABT は Eco-GABT のアミノ基転移と同様のメカニズム(一般的なアミノ基転移反応)で、アミノ基転移が行われていると結論付けられている。触媒中心付近の酵素反応に関わるアミノ酸残基に着目し、NylD<sub>1</sub>、NylD<sub>2</sub> および Ara-GABT のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った(Fig. 6-6)。その結果、Ara-GABT の活性部位の Lys 295 は PLP とシッフ塩基を形成する残基であるが、NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> においても保存されていることが確認された。さらに、PLP と相互作用を有する Gly 134, Ala 135, Tyr 161, Asp 266, Gln 269 および Thr 324 が保存され、基質と相互作用を有する Met 102, Arg 164, Gly 323 および Arg 429 も各酵素間でよく保存されていることが確認された。NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> でも Ara-GABT のアミノ基転移と同様のメカニズムで、アミノ基転移が行われていることを示唆している。また、第5章では Ahx および GABA を基質としたアミノ基転移反応において、NylD<sub>1</sub> と比較して NylD<sub>2</sub> の活性が高いことが確認された。アライメントでは Ara-GABT の Val 268 が NylD<sub>2</sub> では Ile に置換されており、この変異が活性に影響を及ぼしている可能性がある。

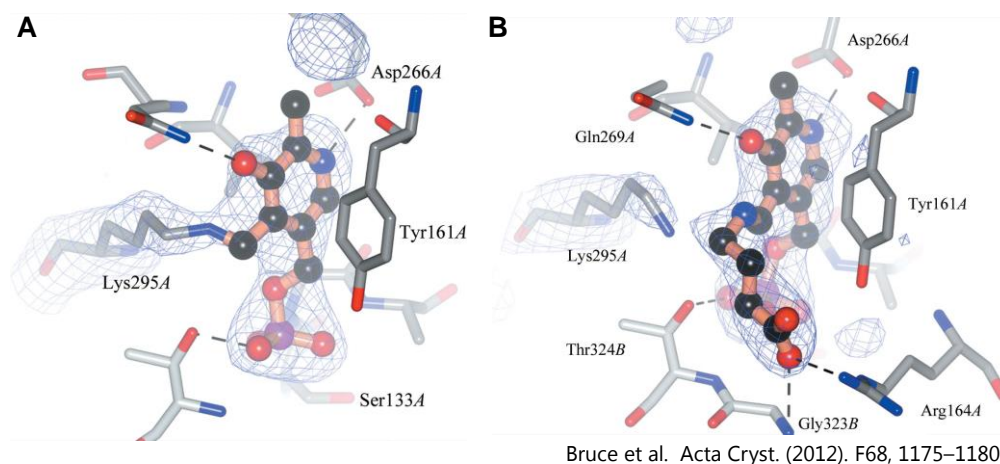


Fig. 6-5 Structure of activesite of the Ara-GABT.

Structure of activesite of the Ara-GABT internal aldimine complex with chain of Lys 295 covalently bound to the aldehydic C atom of PLP (A) and external aldimine complex with the aldehydic C atom of PLP bound to the amine N atom of GABA (B).

Table 6-4 Ara-GABT 触媒中心アミノ残基の作用

残基	作用
Ile 73	活性部位において疎水性の反応場を形成
Met 102	GABA のカルボキシル基と静電的相互作用
Gly 134	PLP のリン酸と静電的相互作用
Ala 135	PLP のリン酸と静電的相互作用
Tyr 161	Val 268 とともに芳香環で PLP をサンドイッチ(外部アルジミン形成促進)
Arg 164	GABA のカルボキシル基と静電的相互作用
Glu 238	Arg429 の側鎖を中性化
Asp 266	PLP の N 原子と塩基対を形成
Val 268	Tyr 161 とともに芳香環で PLP をサンドイッチ(外部アルジミン形成促進)
Gln 269	PLP の N 原子と塩基対を形成
Lys 295	活性部位
Gly 323	GABA のカルボキシル基と静電的相互作用
Thr 324	PLP のリン酸と静電的相互作用
Arg 429	L-グルタミン酸の $\alpha$ -カルボキシル基に結合(逆反応)

Ara-GABT	-----MTTTANELSYRIE-----QKRNINGAFPGPKSQALAERRSAVVAAGVASG	45
NylD1	-----MTATANELSYRIE-----QKRNINGTFPGPKSQALAERRSAVVAAGVASG	45
NylD2	MEFTTRGGPMTVTPDIAPSITDPAQVKASARRLLTELPGPRSRELEAERRRHVTDAGFIT	60
Ara-GABT	VPVYVEDADGGIIRDVDGNSFIDLGSGLAVTSVGASDPAVVAAVQEA-AAHFTHTCF	105
NylD1	VPVYVEDADGGIIRDVDGNSFVDLGSGLAVTSVGASDPAVVAAVQEA-AAHFTHTCF	105
NylD2	QPVFIDRALHALLVDVDGNHIIDFASGLAVTSVGAANPLVAKRAAAQLERFTHTCF	120
Ara-GABT	YEGYVAVTEQLNRLTPGDHAKRTVLFNSGA-EAVENAVKVARLATGRDAVVAFDHA	165
NylD1	YEGYVAVAEQLNRLTPGNHAKRTVLFNSGA-EAVENAIAKVARLATGRDAVVAFDHA	165
NylD2	YSSFVDVCRWLNENTPGDFEKR TALFSTGA-EAVENAIAKIAARAATRRPNVLVFDEA	180
Ara-GABT	NLTMAALTAKAMPYKTNFGPFAPEVYRMPMSYFPREENPEITGA-EAAKRAITMIEK-QIGG	224
NylD1	NLTMAALTAKSMPYKTNFGPFAPEVYRMPMSYFPREENPEITGA-EAAKRAITAIEK-QIGG	224
NylD2	QLTMAMTAKENPYRLNFGPFPGSVFRGPTAPAHNSPN---GPGEALARIEAILA-ENGP	235
Ara-GABT	DQVAAIIIEPIQGGGGFIVPAEGFLPALSEWAKEKGIVFIADIEVQSGFCRTGEWF	284
NylD1	DQVAAIIIEPIQGGGGFIVPAEGFLPALSAWAKEKGIVFIADIEVQSGFCRTGEWF	284
NylD2	ETFAAMVIEPLQGGGGFIVHAPGFLAGLREIATRHGIVLVIDIEIQAGMGRTGKLF	295
Ara-GABT	GVVPDIITMAKGIAGGLPLSAITGRADLLDAVHPGGLGTTYGGNPVACAAALAAIDTMEQ	344
NylD1	GVVPDIITMAKGIAGGMPLSAITGRADLLDAVHPGGLGTTYGGNPVACAAALAAITTMEE	344
NylD2	GIAGDITLTAKALGAGLPLSAATGRAELMNAVHTGGLGTTYAGNPVACEAALAVFELLE	355
Ara-GABT	HDLNGRARHIEELALGKLRELAELSAGGGSVVGDIRGRGAMLAIELVQPGSK-EPNAEL	403
NylD1	HDLNGRARHIEELALGKLRELASET-----SVVGDIRGRGAMLAIELVQPGSK-EPNAEL	398
NylD2	GTLL ENAIRVEAAVRGRLEPLLALN-----GVSSVRGRGAMMAIEFNDESG---PRGDL	406
Ara-GABT	TKAVAAACLKEGVIIILTCGTYGNIIRLLPPLVISDELLIDGLEVLAAAIAKHA-	456
NylD1	TKAVAAACLKEGVIIILTCGTYGNIIRLLPPLVISDDLIDGLEVLANAVKANA-	451
NylD2	AVAAAKKANAHGVLTLTCGTNGNVIIRLLPPLGIEADVLD EGLAVLEASIRSVLS	460

Fig. 6-6 Result of alignment of NylD<sub>1</sub>, NylD<sub>2</sub> and Ara-GABT.

#### 6.4.5 結論

本章では、NylD<sub>1</sub> の高分解能の X 線回折データが取得できる結晶化条件を確認することができた。しかし、構造解析の結果、格子定数が大きいことおよび活性部位の PLP 結合部位にリン酸が結合していることが確認されたため、さらに結晶化条件を最適化する必要がある。また、NylD<sub>1</sub>、NylD<sub>2</sub> および Ara-GABT のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った結果、触媒中心付近の酵素反応に関わるアミノ酸残基が各酵素間でよく保存されていることが確認された。このことは、NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> でも Ara-GABT のアミノ基転移と同様(一般的なアミノ基転移反応)のメカニズムで、アミノ基転移が行われていることを示唆している(Fig. 6-7)。また、Ara-GABT の Val 268 が NylD<sub>2</sub> では Ile に置換されており、この変異が活性に影響を及ぼしている可能性がある。

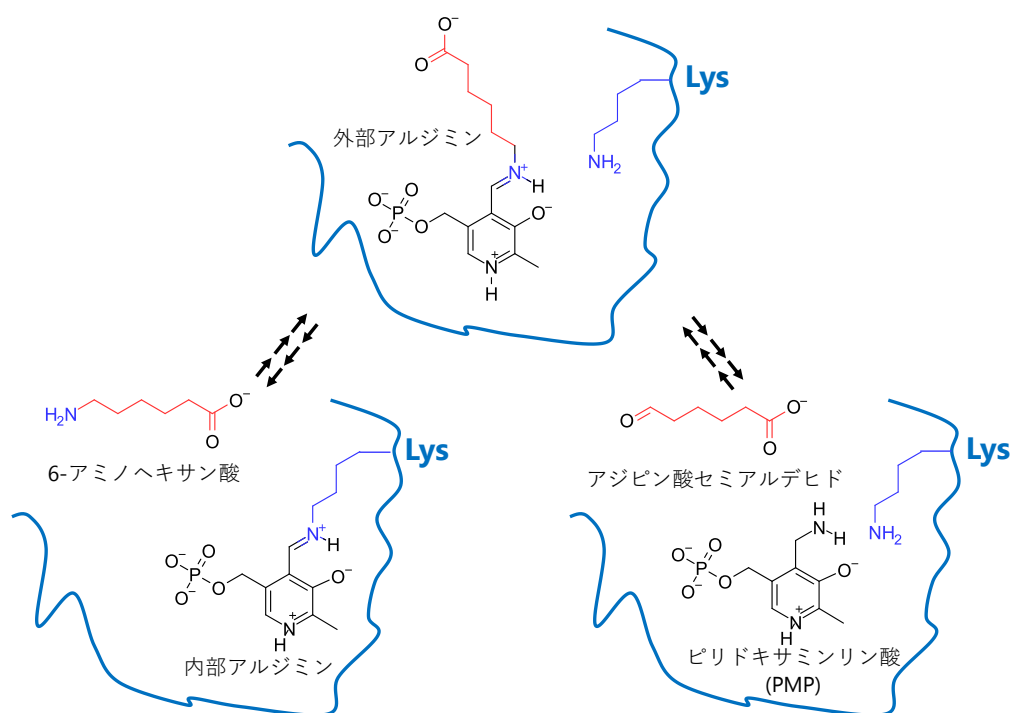


Fig. 6-7 NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> の Ahx を基質とした反応機構



## 参考文献

- 1) Bruce H, Nguyen Tuan A, Mangas Sanchez J, Leese C, Hopwood J, Hyde R, Hart S, Turkenburg JP, Grogan G (2012) Structures of a  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) transaminase from the *s*-triazine-degrading organism *Arthrobacter aurescens* TC1 in complex with PLP and with its external aldimine PLP–GABA adduct. *Acta Crystallogr Sect F* 68: 1175-1180
- 2) Hwang, B-Y., Cho, BK, Yun H, Koteswar K, Kim, B-G (2005) Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *J Mol Catal B Enzym* 37: 47–55
- 3) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- 4) Liu W, Peterson PE, Carter RJ, Zhou X, Langston JA, Fisher AJ, Toney MD (2004) [Crystal structures of unbound and aminooxyacetate-bound *Escherichia coli* gamma-aminobutyrate aminotransferase. *Biochemistry* 43:10896-10905
- 5) Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* 214:549-561
- 6) Percudani R, Peracchi A (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate- dependent enzymes. *EMBO Rep* 4: 850-854
- 7) Phillips RS (2015) Chemistry and diversity of pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1854: 1167-1174. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.028.
- 8) Schirotti D, Peracchi A (2015) A subfamily of PLP-dependent enzymes specialized in handling terminal amines. *Biochim Biophys Acta* 1854: 1200-1211. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.02.023.
- 9) Schneider BL, Ruback S, Kiupakis AK, Kasbarian H, Pybus C, Reitzer L (2002) The *Escherichia coli* *gabDTPC* operon: specific  $\gamma$ -aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. *J Bacteriol* 184:6976-6986. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6976-6986.2002>
- 10) Steffen-Munsberg F, Vickers C, Kohls H, Land H, Mallin H, Nobili A, Skalden L, van den Bergh T, Joosten HJ, Berglund P, Höhne M, Bornscheuer UT (2015) Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnol Adv* 33:566-604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.012
- 11) Storici P, De Biase D, Bossa F, Bruno S, Mozzarelli A, Peneff C, Silverman RB, Schirmer T (2004) Structures of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with  $\gamma$ -ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin. *J Biol Chem* 279: 363-373

- 12) Strong LC., Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse *s*-triazine ring compounds. Appl Environ Microbiol 68: 5973-5980
- 13) Wenche L, Peter E, Richard JC, Xianzhi Z, James AL, Andrew JF, Michael DT (2004) Crystal structures of Unbound and Aminooxyacetate-Bound *Escherichia coli*  $\gamma$ -Aminobutyrate Aminotransferase. Biochemistry 43(34): 10896-905

## 第4編 総括

本論文では代謝経路を利用した有用物質の生産を目的として、KI72株のナイロンモノマー以降の代謝経路の解明を試みた。ナイロンモノマーである6-アミノヘキサン酸(Ahx)を基質とした酵素反応はこれまでに報告がないが、その構造類似性を根拠にGABA代謝経路を参照しAhx代謝経路を予想した。また、GABA代謝関連酵素(アミノトランスフェラーゼ/デヒドロゲナーゼ)よりAhx代謝に役割を果たすNylD/NylE候補配列を抽出し、その機能を確認した。この研究によりAhxはNylD<sub>1</sub>によりアジピン酸セミアルデヒドに、次いでNylE<sub>1</sub>によりアジピン酸まで変換される代謝経路を同定した。また、NylD/NylE共役系を構築し、NylD/NylEをカップリングさせた連続的な反応系を構築した。さらに、構築したNylD/NylE共役系を用い、NylDアミノ基転移活性測定系を確立した。NylD/NylEアイソザイムについても生化学的な検討を行い、Ahx代謝の主役酵素はNylD<sub>2</sub>およびNylE<sub>1</sub>であることを明らかにした。

第1編では、緒論として研究対象であるナイロンに関する問題やそれら問題に対する社会動向、微生物の生物機能を用いたナイロンリサイクルの現状およびわれわれの研究グループがこれまでに明らかにしてきたナイロンオリゴマー加水分解酵素の概論について述べた。

第2編では、NylCのアミノ酸置換と熱安定性との関係について解明するためp2-NylCの界面にアミノ酸置換を施し、熱安定性と構造形成能から議論した。その結果、p2-NylC変異により1)可溶画分に活性型として存在、2)可溶画分に前駆体型として存在、3)沈殿画分に前駆体型として存在、4)フラグメントのみが可溶画分に存在の4つの会合状態に分類できることが明らかとなった。また、有機溶媒中でのナイロン加水分解酵素の構造および機能の解析を行い、有機溶媒濃度によりNylCの二次構造の割合が変化し、それが活性に影響することを明らかにした。

第3編では、KI72株のAhx以降の代謝経路の同定を目的に検討を行った。KI72のゲノム解析では105本のコンティグ配列を得ることができ、この配列中にGABAアミノトランスフェラーゼおよびアジピン酸/コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと相同な配列を探索することでNylD/NylE候補配列を抽出した。そして、KI72株は6-ナイロンモノマーであるAhxをAhxアミノトランスフェラーゼ(NylD<sub>1</sub>)およびASAデヒドロゲナーゼ(NylE<sub>1</sub>)の連続した反応によりアジピン酸へ変換している代謝経路を同定した。また、NylD<sub>1</sub>がAhxをASAへ変換し、その反応にはアミノ基受容体として $\alpha$ -KG/ピルビン酸/グリオキシル酸を利用し、それぞれグルタミン酸/アラニン/グリシンへ変換することを確認した。くわえて、アミノ基転移反応に続く反応として、NylE<sub>1</sub>が

NADP<sup>+</sup>を補酵素として酸化反応により ASA をアジピン酸へ変換することを確認した。また、NylD<sub>1</sub>/NylE<sub>1</sub> 共役系を構築し、NylD<sub>1</sub> の Ahx 変換活性測定系に応用した。構築した共役系における Ahx⇒アジピン酸変換効率は理論値の 90%以上であることを明らかにした。あわせて、NylD/NylE アイソザイムの生化学的特徴づけを行い、それらが KI72 株の Ahx 代謝にどのように関連しているかを確認した。NylE アイソザイムのアッセイにより、Ahx/Adipate 代謝には NylE<sub>1</sub> が、GABA/Succinate 代謝には NylE<sub>2</sub> が関連していることを示唆した。また、NylE は酸化反応に特異的な酵素でその反応においては NADP<sup>+</sup>選択性を有することが確認した。NylE アイソザイムのアッセイでは NylD<sub>2</sub> において基質を Ahx/GABA としたものの双方でアミノ基転移活性が高いことが確認した。この結果により、NylD<sub>1</sub> は GABA 代謝の、NylD<sub>2</sub> は Ahx 代謝の主役酵素であることを示唆した。さらに、NylD<sub>1</sub> の機能および反応機構を理解するため、結晶化条件の検討を行った。その結果、NylD<sub>1</sub> の高分解能の X 線回折データが取得できる結晶化条件を確認することができた。また、NylD<sub>1</sub>、NylD<sub>2</sub> および Ara-GABT のアミノ酸配列を用いてアライメントを行い、触媒中心付近の酵素反応に関わるアミノ酸残基が各酵素間でよく保存されていることが確認した。これにより、NylD<sub>1</sub> および NylD<sub>2</sub> でも Ara-GABT のアミノ基転移と同様(一般的なアミノ基転移反応)のメカニズムで、アミノ基転移が行われていることを示唆した。

以上のことから、NylABC および本研究で同定した NylD/NylE 反応を用いて、理論的には不要ナイロンからアジピン酸へバイオコンバージョンが可能であることを実証した。しかし、より詳細な NylD/NylE の機能および反応機構を理解するためには、速度論的解析や結晶構造解析などの手法を用いて研究を進めることが今後重要と考えられる。また、NylA~NylE を用いた不要ナイロンのバイオコンバージョンを産業として確立するためには、補酵素/副原料の供給やそのリサイクル等、反応の最適化が必要である。さらに、KI72 株のアジピン酸までの代謝経路は同定できたが、依然としてそれ以降にどのような変換がなされるのかは不明である。アジピン酸以降の代謝経路の解明により、より有用な物質の生産への応用が期待できる。



## 論文目録

本論文は主として下記の資料をまとめたものである。

### 第2編第2章 ナイロン分解酵素の有機溶媒中における構造と機能

(\*2 Mutations affecting the internal equilibrium of the reaction catalyzed by 6-aminohexanoate-dimer hydrolase.)

Negoro S, Kawashima Y, Shibata N, Kobayashi T, Baba T, Lee YH, Kamiya K, Shigeta Y, Nagai K, Takehara I, Kato D, Takeo M, Higuchi Y.

2016 年 9 月発行

FEBS Letters 第 590 巻 18 号 3133-3143 頁に掲載

### 第3編第3章 *Arthrobacter* sp. KI72 のドラフトゲノム解析

(\*3 Draft genome sequence of the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain KI72.

Takehara I, Kato DI, Takeo M, Negoro S.

2017 年 4 月発行

Genome Announcement 第 5 巻 17 号 e00217-17 頁に掲載

### 第3編第4章 *Arthrobacter* sp. KI72 における Ahx 代謝系の同定

(\*4 Metabolic pathway of 6-aminohexanoate in the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. KI72: identification of the enzymes responsible for the conversion of 6-aminohexanoate to adipate.

Takehara I, Fujii T, Tanimoto Y, Kato DI, Takeo M, Negoro S.

2017 年 11 月発行

Applied Microbiology and Biotechnology 第 102 巻 2 号 801-814 頁に掲載

## 謝辞

この研究を行うにあたり、終始懇篤なるご指導/ご鞭撻を賜りました恩師 根来誠司教授に心から感謝いたします。また、多大なるご助言を賜りました兵庫県立大学 工学研究科 武尾正弘准教授、基質合成をご指導くださった鹿児島大学 理工学域理学系 理工学研究科(理学系) 加藤太一郎助教、分子動力学シミュレーションをご指導くださった筑波大学大学院 数理物質科学研究科 重田育照教授および佐藤竜馬博士、X線構造解析をご指導兵庫県立大学大学院 生命理学研究科 樋口芳樹教授および柴田直樹准教授、CD測定およびそのデータ解析をご指導くださった大阪大学 蛋白質研究所 後藤祐児教授および李映昊講師、本論文の校閲をしていただいた兵庫県立大学大学院 工学研究科 山名一成教授および今高寛晃教授に深く感謝いたします。

また、実験に協力いただきました、衣笠凌氏、伊東雅人氏、岡崎秀明氏、藤井翼氏、橋本悠氏に深く感謝いたします。

最後に、国内留学として3年間研究活動に専念させていただき、その活動に対してご支援を賜りましたシスメックス株式会社および同社ご助力いただきました方々に厚く御礼申し上げます。